

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ



Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων των
φαρμακευτικών φυτών *Carthamus lanatus*, *Crepis sancta* και
Amaranthus blitum με συνδυασμό μοριακών και χημικών μεθόδων

Study of the antioxidant capacity of medicinal plants extracts from
Carthamus lanatus, *Crepis sancta* and *Amaranthus blitum* using
molecular and chemical methods

Διπλωματική εργασία



Σκαπέρδα Ζωή-Βασιλική

Όνομα πατρός: Χρήστος

Λάρισα 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος(επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σοφία Μητάκου: Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε, ώστε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Πρέπει να τον ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές, τις γνώσεις και τα ερεθίσματα που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την κ. Μητάκου Σοφία, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου της, για τις πληροφορίες που μας παρείχαν σχετικά με τα φαρμακευτικά εδώδιμα φυτά που αποτέλεσαν αντικείμενο αυτής της μελέτης, όπως επίσης και για την εκχύλιση, παραλαβή και ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Επιπροσθέτως δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Θάλεια Κερασιώτη για την καθοριστική βοήθειά της. Θα ήταν παράληψή μου να μην αναφέρω την απέραντη στήριξη αλλά και βοήθεια που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της.

Θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω συνολικά όλη την ομάδα του εργαστηρίου, και συγκεκριμένα τους διδάκτορες Κωσταντίνο Γερασόπουλο και Καφαντάρη Ιωάννη, και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Πρίφτη, Κούκα Παρασκευή και Υπάτιο Σπανίδη, οι οποίοι με τις συμβουλές και την στήριξή τους αλλά και με το φιλικό κλίμα που καλλιέργησαν στο εργαστήριο βοήθησαν στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης αυτής της πτυχιακής.

Contents

| | |
|--|----|
| Περιεχόμενα εικόνων..... | 6 |
| Περιεχόμενα πινάκων | 7 |
| Περιεχόμενα διαγραμμάτων..... | 7 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 9 |
| SUMMARY | 10 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 12 |
| 1.1 Ιστορική Αναδρομή | 12 |
| 1.2 Ελεύθερες Ρίζες..... | 13 |
| 1.2.1 Πώς Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ρίζες Στον Οργανισμό Μας..... | 17 |
| 1.2.2 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου | 19 |
| 1.2.3 Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες | 23 |
| 1.2.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες..... | 24 |
| 1.3 Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών | 26 |
| 1.3.1 Αντιοξειδωτική ουσία..... | 26 |
| 1.3.2 Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών..... | 27 |
| 1.3.3 Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών | 27 |
| 1.4 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις..... | 27 |
| 1.4.1 Πολυφαινόλες | 28 |
| 1.4.2 Χημική Δομή πολυφαινολών | 28 |
| 1.4.3 Τάξεις Πολυφαινολών | 29 |
| 1.4.4 Φυσιολογικές δράσεις των Πολυφαινολών..... | 32 |
| 1.4.5 Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών | 33 |
| 1.5 Τα είδη των εδώδιμων χόρτων που μελετήθηκαν..... | 34 |
| 1.5.1 <i>Amaranthus blitum</i> (VEM_A1) | 35 |
| 1.5.2 <i>Crepis sancta</i> | 36 |
| 1.5.3 <i>Carthamus lanatus</i> | 38 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ | 40 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 41 |
| 3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH* . | 41 |
| 3.1.α. Αρχή της μεθόδου | 41 |
| 3.1.β. Πειραματική διαδικασία..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 3.1.γ. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση..... | 43 |
| 3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ^{•+} . | 43 |
| 3.2.α. Αρχή της μεθόδου | 43 |
| 3.2.β. Πειραματικό πρωτόκολλο..... | 45 |
| 3.2.γ. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση..... | 46 |
| 3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Reducing power (RPA)..... | 47 |
| 3.3.α. Αρχή της Μεθόδου | 47 |
| 3.3.β. Πειραματική Διαδικασία | 48 |
| 3.3.γ. Υπολογισμοί | 50 |
| 3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂ ^{•-} (Superoxide radical scavenging activity) | 50 |
| 3.4.α. Αρχή της μεθόδου | 50 |
| 3.4.β. Πειραματική διαδικασία..... | 50 |
| 3.4.γ. Υπολογισμοί | 51 |
| 3.5 Ολικά Πολυφαινόλικά -Follin ciocalteau..... | 51 |
| 3.5.α Αρχή της μεθόδου | 51 |
| 3.5.β. Πειραματική διαδικασία | 51 |
| 3.6 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης..... | 52 |
| 3.6.1. Γενικά..... | 52 |
| 3.6.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA..... | 54 |
| 3.6.3. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA | 55 |
| 3.7. ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ..... | 59 |
| Μυϊκά κύτταρα C2C12 | 59 |
| ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ | 60 |
| 3.7.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)..... | 61 |
| 3.7.2 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο ΧΤΤ ... | 61 |
| 3.7.3 Κυτταρομετρία Ροής | 63 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 66 |
| 4.1 Ολικά Φαινόλικά και Ολικά Φλαβονοειδή -Follin ciocalteau | 66 |
| 4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•..... | 66 |
| 4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{•+} | 68 |

| | |
|--|----|
| 4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER (RPA) | 70 |
| 4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας O ₂ - • (Superoxide radical scavenging activity) | 71 |
| 4.6 Αποτελέσματα της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα AAPH και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους..... | 73 |
| 4.7 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος Carthamus lanatus με τη μέθοδο XTT | 75 |
| 4.8 Προσδιορισμός επιπέδων GSH με κυτταρομετρία ροής | 76 |
| 4.9 Προσδιορισμός επιπέδων ROS με κυτταρομετρία ροής | 79 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 81 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 87 |

Περιεχόμενα εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1: Δράσεις ελευθέρων ριζών..... | 14 |
| Εικόνα 2: Οξυγόνο μονής και τριπλής κατάστασης..... | 15 |
| Εικόνα 3: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια..... | 18 |
| Εικόνα 4: Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων. | 18 |
| Εικόνα 5: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από PMN | 21 |
| Εικόνα 6: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών | 23 |
| Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες..... | 24 |
| Εικόνα 8: Οι κύριες μορφές οξειδωτικής επίθεσης που δέχεται το κύτταρο. | 25 |
| Εικόνα 9: τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού..... | 26 |
| Εικόνα 10: Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες πολυφαινολών | 29 |
| Εικόνα 11: τα εκχυλίσματα των ελληνικών εδώδιμων χόρτων..... | 34 |
| Εικόνα 12: <i>Amaranthus blitum</i> | 35 |
| Εικόνα 13: <i>Crepis sancta</i> | 37 |
| Εικόνα 14: <i>Carthamus lanatus</i> | 38 |
| Εικόνα 15: Η αναγωγή του DPPH* σε DPPH:H..... | 41 |
| Εικόνα 16: Παραγωγή της ρίζας του ABTS* μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O ₂ | 44 |
| Εικόνα 17: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του ABTS*+ | 44 |
| Εικόνα 18: Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου (O ₂ ⁻) μέσω του συστήματος μεθοσυλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμιδο αδενοκλεοσίδιο (NADH)..... | 50 |
| Εικόνα 19: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. | 53 |
| Εικόνα 20: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•..... | 56 |
| Εικόνα 21: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin..... | 58 |
| Εικόνα 22: C ₂ C ₁₂ κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο | 60 |
| Εικόνα 23: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα | 61 |
| Εικόνα 24: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής | 64 |
| Εικόνα 25: Κυτταρόμετρο ροής | 65 |

Περιεχόμενα πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου..... | 16 |
| Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου..... | 16 |
| Πίνακας 3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων..... | 42 |
| Πίνακας 4: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη | 42 |
| Πίνακας 5: Πίνακας σειράς προσθήκης διαλυμάτων | 46 |
| Πίνακας 6: Πίνακας προσθήκης διαλυμάτων καμπύλη ουσίας..... | 46 |
| Πίνακας 7: Πίνακας σειράς προσθήκης διαλυμάτων..... | 49 |
| Πίνακας 8: Πίνακας προσθήκης διαλυμάτων..... | 49 |
| Πίνακας 9: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent (FCR). | 52 |
| Πίνακας 11: Ποσότητες αντιδραστηρίων..... | 58 |
| Πίνακας 10: ποσοστό % ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου | 66 |

Περιεχόμενα διαγραμμάτων

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1: Η % αναστολή της ρίζας DPPH•από το εδώδιμο χόρτο GREM_3..... | 66 |
| Διάγραμμα 2: Η % αναστολή της ρίζας DPPH•από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3 | 67 |
| Διάγραμμα 3: Η % αναστολή της ρίζας DPPH•από το εδώδιμο χόρτο VEM_A1 | 67 |
| Διάγραμμα 4: Η % αναστολή της ρίζας ABTS από το εδώδιμο χόρτο GREM_3. | 68 |
| Διάγραμμα 5: Η % αναστολή της ρίζας ABTS από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3. | 69 |
| Διάγραμμα 6: Η % αναστολή της ρίζας ABTS από το εδώδιμο χόρτο VEM_A1 | 69 |
| Διάγραμμα 7: Η αναγωγική ισχύς του εδώδιμου χόρτου GREM_3..... | 70 |
| Διάγραμμα 8: Η αναγωγική ισχύς του εδώδιμου χόρτου LAEM_3. | 70 |
| Διάγραμμα 9: Η αναγωγική ισχύς του εδώδιμου χόρτου VEM_A1. | 71 |
| Διάγραμμα 10: Η % αναστολή της ρίζας O ₂ από το εδώδιμο χόρτο GREM_3..... | 72 |
| Διάγραμμα 11: Η % αναστολή της ρίζας O ₂ από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3. | 72 |
| Διάγραμμα 12: Η % αναστολή της ρίζας O ₂ από το εδώδιμο χόρτο VEM_A1. | 73 |
| Διάγραμμα 13: Η % αναστολή της ρίζας AAPH από το εδώδιμο χόρτο GREM_3..... | 74 |
| Διάγραμμα 14: Η % αναστολή της ρίζας AAPH από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3. | 74 |
| Διάγραμμα 15: Η % αναστολή της ρίζας AAPH από το εδώδιμο χόρτο VEM_A1. | 75 |
| Διάγραμμα 16: Αποτελέσματα από τη μέθοδο XTT..... | 76 |
| Διάγραμμα 17: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα GSH. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα της GSH σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος <i>Carthamus lanatus</i> (μg /ml). | 77 |
| Διάγραμμα 18: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH). | 78 |
| Διάγραμμα 19: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα των ROS σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος <i>Carthamus lanatus</i> (μg /ml).. | 79 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

| | | |
|-----------------------------------|--|---|
| AAPH | [2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride)] | |
| ABTS | [azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)] | |
| DMSO | (Dimethyl Sulfoxide) | Διμέθυλο σουλφοξείδιο |
| DNA | (Deoxyribonucleic Acid) | Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ |
| DPPH | (1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl) | 1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | Αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ |
| HDL | (High-Density Lipoprotein) | υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη |
| HRP | (Horseradish Peroxidase) | Υπεροξειδάση |
| LDL | (Low-Density Lipoprotein) | χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη |
| NFC | (Not From Concentrated) | (χυμός) μη προερχόμενος από συμπύκνωμα |
| PON 1 | (Paraoxonase) | Παραοξονάση 1 |
| PPARγ | (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) | γ-υποδοχείς του ενεργοποιητή του πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωματίων |
| RNAse | (Ribonuclease) | Ριβονουκλεάση |
| RNS | (Reactive Nitrogen Species) | δραστικές μορφές αζώτου |
| RO• | (alkoxyl radical) | ρίζα του αλκοξυλίου |
| ROO• | (peroxyl radicals) | ρίζες περοξυλίου |
| ROS | (Reactive Oxygen Species) | δραστικές μορφές οξυγόνου |
| SET | (Single Electron Transfer) | μεταφορά ηλεκτρονίου |
| TGFb1 | (Transforming Growth Factor beta 1) | |
| UV | (ultra violet) | υπεριώδης ακτινοβολία |
| H₂O₂ | (hydrogen peroxide) | υπεροξείδιο του υδρογόνου |
| O₂^{•-} | (superoxide radicals) | ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος |
| OH• | (hydroxyl radicals) | ρίζες υδροξυλίου |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ατόμων άρχισε να υιοθετεί έναν διαφορετικό τρόπο ζωής, τόσο ως μέσο πρόληψης χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές νόσοι και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Πάρκινσον, Αλτσχάιμερ) όσο και ως μέσο αντιμετώπισης της πρόωρης γήρανσης και γενικότερα ως μέσο βελτιστοποίησης της υγείας τους. Αποτέλεσμα αυτού είναι και η ανάγκη για διατροφή με προϊόντα τα οποία, εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους, έχουν και ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Ένας βασικός λόγος για αυτό είναι η ύπαρξη φυσικών βιοδραστικών μορίων στις φυτικές τροφές. Στις φυτικές πολυφαινόλες, μια κατηγορία τέτοιων μορίων, έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η σημαντικότερη είναι η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, να δρουν δηλαδή ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται μια ανισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Για αυτό το λόγο στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τριών (3) αφεψημάτων χόρτων με τις κοινές ονομασίες γουρουνάκι (*Carthamus lanatus*), λαδάκι (*Crepis sancta*) και βλίτο (*Amaranthus blitum*). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις (4) in vitro μέθοδοι. Οι τρεις από αυτές στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH•, ABTS•+ και της ρίζας υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) από τις πολυφαινολικές ενώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων από τα εδώδιμα χόρτα. Η τέταρτη μέθοδος, η αναγωγή του Fe^{+3} (Reducing Power Assay), αφορά την ικανότητα αυτών των εκχυλισμάτων να ανάγουν οξειδωμένα μόρια. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι και τα τρία φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν τόσο ικανότητα εξουδετέρωσης των παραπάνω ριζών όσο και αναγωγική δράση, ενώ την ισχυρότερη ικανότητα παρουσίασε συνολικά το *Carthamus lanatus*. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των εκχυλισμάτων οφείλονται στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολών που περιέχονται σε αυτά.

Ακολούθησε η μελέτη της ικανότητας των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα της ρίζας AAPH•. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι και τα τρία φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν προστατευτική δράση έναντι της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, ενώ την ισχυρότερη προστατευτική δράση παρουσίασε το *Carthamus lanatus*.

Στο *Carthamus lanatus* το φυτικό εκχύλισμα που παρουσίασε την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και τη μεγαλύτερη αναγωγική δράση, προχωρήσαμε σε περαιτέρω μελέτες. Μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του σε κύτταρα μυοβλαστών ποντικού (κυτταρική σειρά C2C12). Αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική συγκέντρωση του *Carthamus lanatus* με τη μέθοδο XTT και στη συνέχεια τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσίασε μια τάση μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 µg/ml. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα κύτταρα που τους χορηγήθηκε το φυτικό εκχύλισμα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με κύτταρα control, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των ROS.

Έτσι, τα παραπάνω φυτικά εκχυλίσματα δείχνουν να έχουν αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται αυτή η δράση. Κατά συνέπεια με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προτείνεται η ανάκτηση, με χρήση σύγχρονων και ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία μεθόδων, των φυτικών πολυφαινόλων που περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στα αφεψήματα των άγριων εδάδωμων φυτών, και η χρήση τους είτε για την ενίσχυση άλλων τροφών είτε για την δημιουργία νέων προϊόντων (συμπληρώματα διατροφής κ.α.).

SUMMARY

In recent years, a growing number of people have adopted a different way of life, as a means of both preventing chronic diseases such as cancer, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases (Parkinson's, Alzheimer's) and premature aging, and in general as a way to improve their health. The result was the need for a diet based on products which, apart from their nutritional properties, have beneficial effects on human health. Important evidence that increased consumption of fruits and vegetables reduces the frequent incidents of the aforementioned diseases have been reported in numerous studies. A key reason for this is the existence of natural bioactive molecules in plant foods. Plant polyphenols, a group of such molecules exhibit many important biological properties. The most important is their ability to neutralize free radicals, and so they act as antioxidants factors, protecting from oxidative stress. Oxidative stress is a condition in which an imbalance is observed between pro-oxidative and antioxidant mechanisms in favor of the former and is

either due to increased production of free radicals of oxygen or to deficiency of cellular antioxidant mechanisms.

Due to the increased demand for plant-rich polyphenols, industries are intensifying the research and production of such innovative products with increased nutritional value. For this reason, we have studied the antioxidant properties of three (3) plant extracts with the common names *Carthamus lanatus*, *Crepis sancta* and *Amaranthus blitum*. In total, four (4) in vitro methods were used. Three of these are based on the radical scavenging activity against DPPH •, ABTS •⁺ and peroxide (O₂ - •) radicals. The fourth method, the Reducing Power Assay of Fe³⁺ is related to the ability of these extracts to reduce oxidized molecules.

The results made showed that all three plant extracts showed both scavenging and reducing activity. The most potent extracts was that of *Carthamus lanatus*. The differences observed between the different extracts were due to the different composition and mechanism of activity of the polyphenols contained in them. It was also examined the ability of the extracts to protect plasmid DNA from breakage induced by ROO• radical. The results showed that all three plant extracts showed a protective effect against the single-stranded breakage of DNA fragments, while *Carthamus lanatus* had the strongest protective effect.

Further studies were carried out in *Carthamus lanatus*, the plant extract with the strongest scavenging activity and the greatest reducing power activity. Its antioxidant properties were studied in mouse myoblast cells (C2C12). Initially, it was determined the cytotoxic concentration of *Carthamus lanatus* by the XTT method, and then the levels of glutathione (GSH) and free radicals (ROS) by flow cytometry. The XTT method showed that the cytotoxic concentration of *Carthamus lanatus*, was above 100 µg / ml. Moreover, according to the results, increased levels of glutathione were observed in the cells treated with the plant extract relative to control cells, while no statistically significant differences were observed in ROS levels.

Thus, the above plant extracts exhibited antioxidant activity. However further studies are required to elucidate the mechanism by which this action is exerted. Consequently, the results of this study suggested to recover the plant polyphenols contained in the tested wild green plants, using modern and safe methods for human health, and to use them for the reinforcement of the antioxidant activity of other foods or to create new products (food supplements, etc.).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Το **οξυγόνο (O_2)** είναι ένα πολύ κρίσιμο και βασικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής και χρησιμοποιείται στη μετατροπή της τροφής σε ενέργεια, οξειδώνοντας τις τροφές. Ωστόσο, αν και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για όλες τις μορφές αερόβιας ζωής, η υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη χορήγησή του μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα βλαπτική για τους οργανισμούς. Το **O_2** κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει **τοξικό**, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία, κάτι που χαρακτηρίζεται ως «βιοχημικό παράδοξο». Αυτό πρώτη φορά παρατηρήθηκε από τον Priestley το 1775, ο οποίος ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν τη δημοσίευση της θεωρίας των Gersham et al., το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, το 1956, ο Denham Harman πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και την περιέγραψε ως το κακό περιεχόμενο του κουτιού της Πανδώρας. Αργότερα έθεσε ως αξίωμα ότι αυτά τα συστατικά έχουν ρόλο στην γήρανση μέσω της πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA (ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA) και προκαλώντας μεταλλαξιγενέσεις, καρκίνο και κυτταρική βλάβη. Η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το 1969 από τους McCord και Fridovich σήμανε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε όταν το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έκτοτε, είναι σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι πλέον γνωστό, ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς

και άλλοτε βλαπτικές (Valko et al. 2007). Ο όρος οξειδωτικό στρες ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως «η διαταραχή της ισορροπίας των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών» (Sies, H., et al., 1985).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεων τους, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.2 Ελεύθερες Ρίζες

Σε άρθρο που δημοσιεύτηκε το 1954 στο επιστημονικό περιοδικό Science προτάθηκε για πρώτη φορά ότι, ο παράγοντας που ενοποιούσε τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με αυτά της «δηλητηρίασης» από το O₂, ήταν αυτό που αποκαλούμε ελεύθερες ρίζες (ROS).

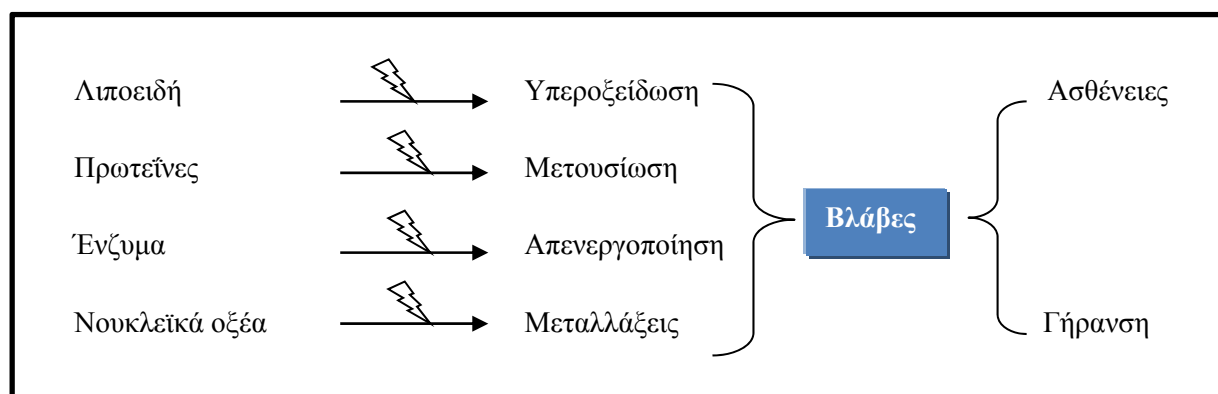
Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, δημιουργούν ζεύγη με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα συζευγμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Ατομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που

συμμετέχουν. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται **οξειδοαναγωγικές** (*redox*), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο (π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση, κύκλος του κιτρικού οξέος).

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1990). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ.. Κατά συνέπεια, μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge 1990). Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επί μακρόν. Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

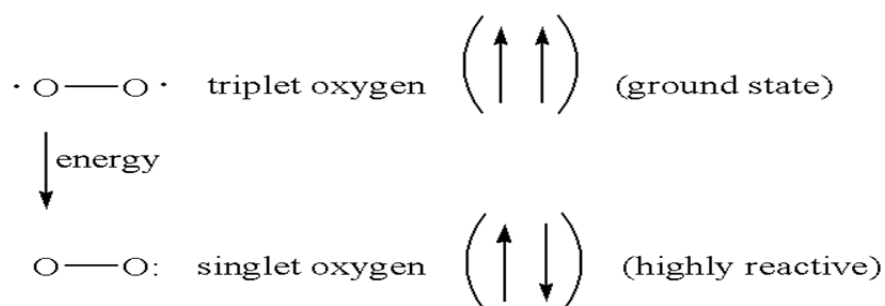
Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι οποίες οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών.



Εικόνα 1: Δράσεις ελευθέρων ριζών

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani et al., 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin & Brumaghim, 2009; Pani et al., 2010) ή τον άνθρακα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το οξυγόνο μπορεί να γίνει τοξικό. Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με $*O_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η ενεργοποίηση του οξυγόνου μπορεί να συμβεί μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Δηλαδή, είτε μέσω απορρόφησης της επαρκούς ενέργειας για την αναστροφή του spin σε ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είτε μέσω μονοσθενούς αναγωγής. Έτσι, θα προκύψει ο σχηματισμός οξυγόνου μονής κατάστασης, του οποίου τα ηλεκτρόνια έχουν αντιπαράλληλα spin, και συνεπώς μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις ταυτόχρονης μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων.



Εικόνα 2: Οξυγόνο μονής και τριπλής κατάστασης

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell, 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) (Gutteridge,

1995). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξειδίο του αζώτου NO^\bullet και το διοξειδίο του αζώτου NO_2^\bullet καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO^-) (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

Στους πίνακες παρακάτω φαίνονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών:

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

| ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ | |
|--|--|
| <u>Radicals</u> | <u>Non-radicals</u> |
| Ανιόν Σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) | Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2) |
| Ρίζα Υδροξυλίου (OH^\bullet) | Υποχλωριώδες Οξύ (HOCl) |
| Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^\bullet) | Υποβρωμιώδες Οξύ HOBr) |
| Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^\bullet) | Όζον (O_3) |
| Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^\bullet) | Μονήρες Οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) |

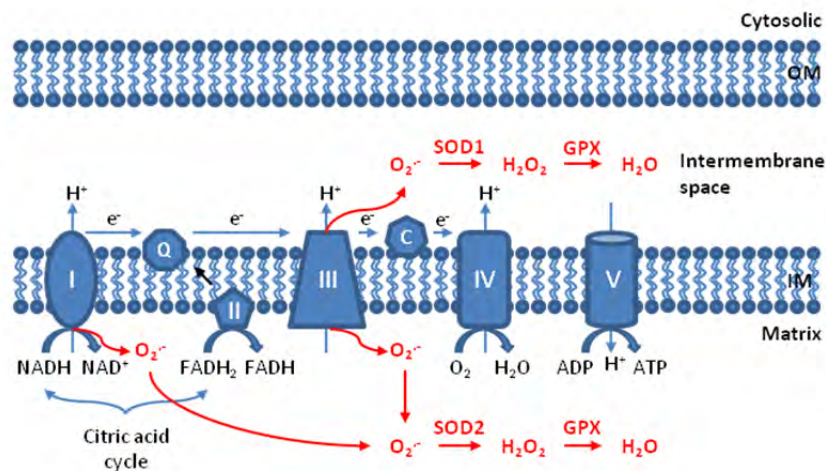
Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

| ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ | |
|--|--------------------------------------|
| <u>Radicals</u> | <u>Non-radicals</u> |
| Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO^\bullet) | Νιτρώδες Οξύ (HNO_2) |
| Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO_2^\bullet) | Κατιόν Νιτροσυλίου (NO^+) |
| | Ανιόν Νιτροσυλίου (NO^-) |

1.2.1 Πώς Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ρίζες Στον Οργανισμό Μας

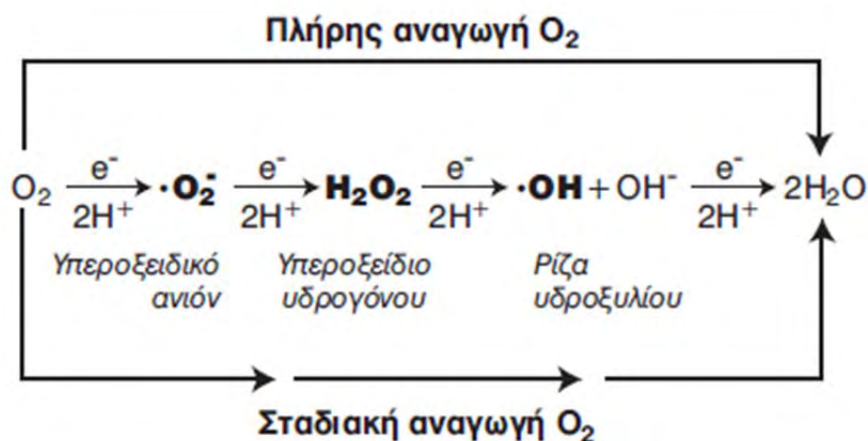
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Αρχικά, το οξυγόνο που εισέρχεται στον οργανισμό με την αναπνοή, μεταφέρεται μέσω του αίματος στα κύτταρα. Το 95% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, η οποία αποθηκεύεται υπό τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οξείδωσης των τροφών στα μιτοχόνδρια παράγονται διάφορα προϊόντα, ανάμεσα στα οποία είναι και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο. Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες:

A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου.



Εικόνα 3: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

Β) Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου που χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο (προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο) παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\bullet -}$, το H_2O_2 και το OH^{\bullet} .



Εικόνα 4: Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων, που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι βλάβες.

Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα (Vainio et al., 1999). Τέτοια κύτταρα είναι και τα φαγοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Συμπερασματικά, οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητα ενδιάμεσα στοιχεία στον κυτταρικό μεταβολισμό. Η παραγωγή τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ανθρώπινη ζωή, ενώ επηρεάζεται και από εξωγενείς παράγοντες. Αυτοί μπορεί να είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός), το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης όπως το όζον της τροπόσφαιρας (ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης) το οποίο προκαλεί υπεροξειδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων, καθώς και διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό (ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξειδίο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες.

1.2.2 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Υπάρχουν τόσο ενδοκυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.

1.2.2.A. Ενδοκυτταρικές πηγές:

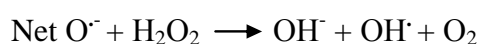
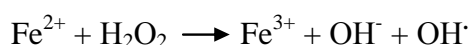
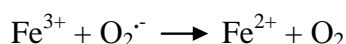
1.2.2.A.i) Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 (Chance et al.,

1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH_2 στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $\text{O}_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $\text{O}_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν (ONOO^-), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} .

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Boveris and Cadenas, 1997).

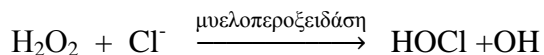
1.2.2.A.ii) Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani and Evans, 1979).

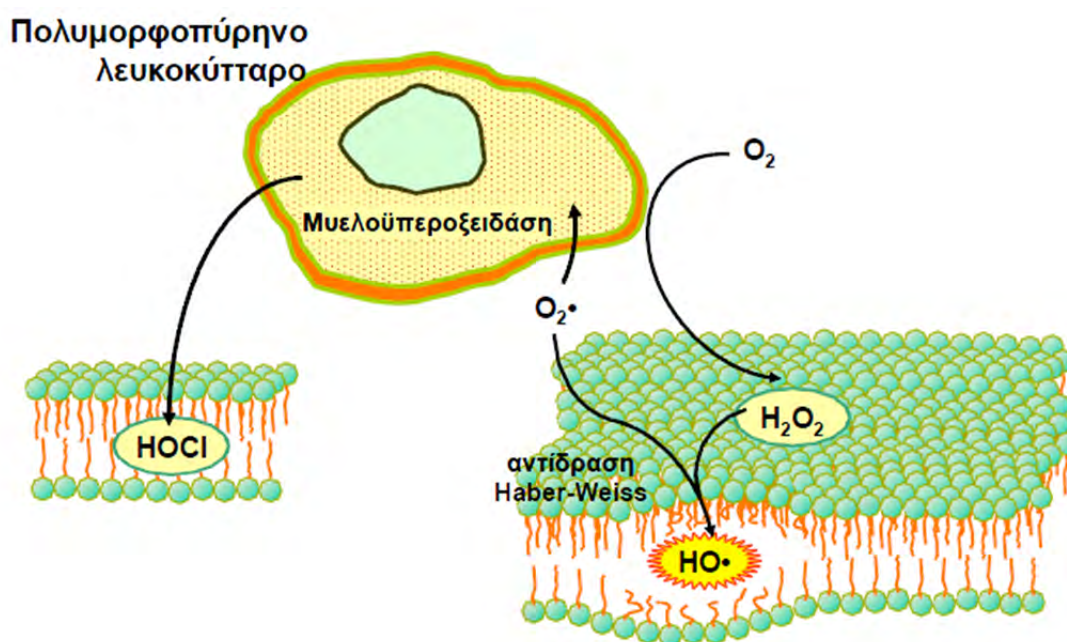
Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $\text{O}_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το $\text{O}_2^{\cdot-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH

οξειδάση (Petrone et al., 1992). Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH^{\cdot} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$.



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης, ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani and Evans, 1979; Meydani et al., 1992). Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει $HOCl$.



Εικόνα 5: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από PMN

1.2.2.A.iii) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuppasamy and Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του

μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του $O_2^{\cdot-}$.

Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

1.2.2.A.iv) Κυτόχρωμα P_{450}

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P_{450} (Yu, 1994).

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\cdot-}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell and Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $O_2^{\cdot-}$.

1.2.2.A.v) Αυτοοξειδωση μορίων

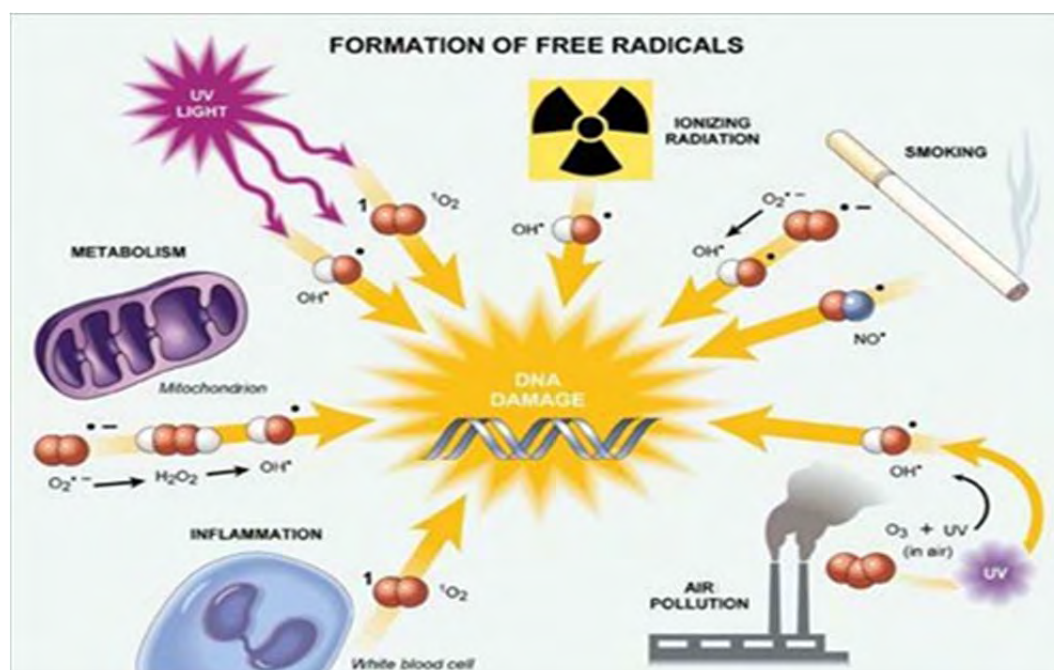
Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν (ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο) σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

1.2.2.B. Εξωκυτταρικές πηγές :

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα (Koren, 1995; Victoria, 1994) είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες.

Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000).

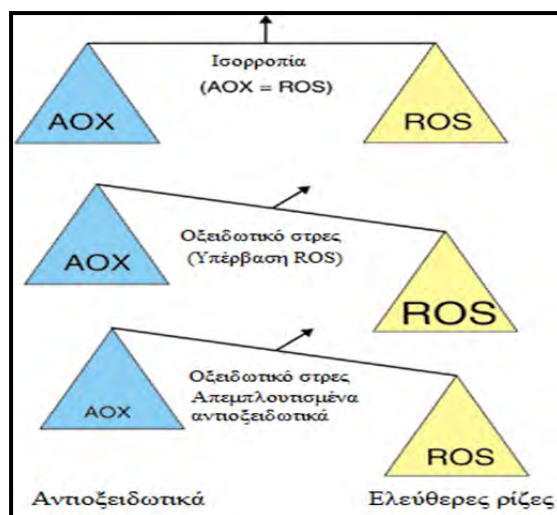
Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner and Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).



Εικόνα 6: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.2.3 Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες

Γενικότερα, σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μια διαταραχή στην ισορροπία προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage). Αυτή η κατάσταση, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress) (Sies, 1991). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.



Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες

1.2.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

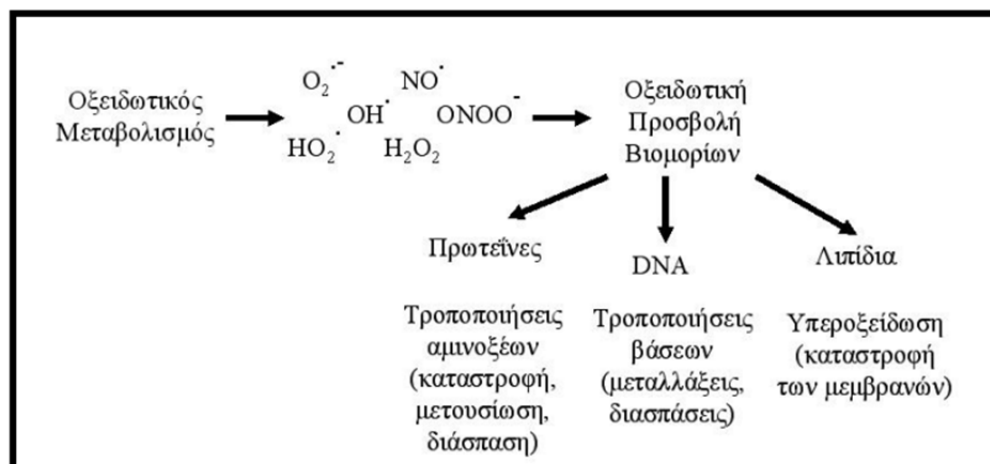
Το οξειδωτικό στρες μπορεί να επιδρά αρνητικά σε βιομόρια όπως τα παρακάτω:

- Λιπίδια:** Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO· κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτησης και αλληλεπίδρασης με οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1990).
- Πρωτεΐνες:** Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH·, το RO· και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες με άμεση και έμμεση καταστροφή από τις ROS υφίστανται αλλαγές στην τριτοταγή τους

δομή, εκφυλισμός και τελικά καταστροφή. Οι επιπτώσεις αυτής της καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).

- **DNA:** Παρόλο που το DNA είναι σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Για παράδειγμα η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Beckman & Koppenol, 1996; Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Halliwell, 2001) (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών που συμβαίνουν και το κύτταρο όμως είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη.



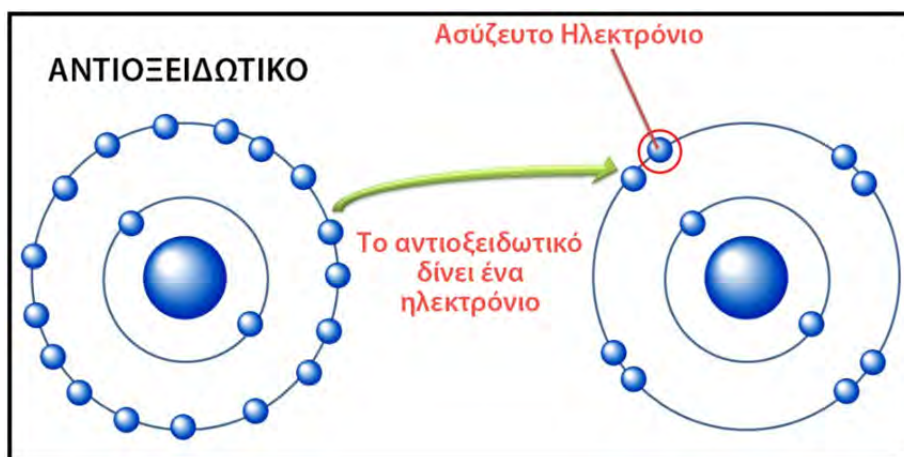
Εικόνα 8: Οι κύριες μορφές οξειδωτικής επίθεσης που δέχεται το κύτταρο.

1.3 Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, οι ελεύθερες ρίζες είναι τοξικές για όλους τους οργανισμούς και κυρίως για τους αερόβιους, οι οποίοι έρχονται σε άμεση επαφή με το O_2 . Έτσι, η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών τους οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών, που αφορούν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, οι οργανισμοί που διαθέτουν δυνατότητα κίνησης μπορούν έμμεσα να αποφύγουν το οξειδωτικό στρες, αποφεύγοντας περιοχές υψηλής πίεσης O_2 , όπως έχει παρατηρηθεί στα βακτήρια, ενώ στους πολυκύτταρους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί αποδοτικοί τρόποι μεταφοράς και τροφοδότησης των ιστών με οξυγόνο διατηρώντας όσο το δυνατόν τα επίπεδα του χαμηλά. Εκτός όμως από αυτούς, έχουν εξελιχθεί ειδικότεροι κυτταρικοί βιοχημικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας που αντισταθμίζουν άμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

1.3.1 Αντιοξειδωτική ουσία

Οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων ορίζεται ως αντιοξειδωτική ουσία (Krinsky, 2002) (Kaplan et al., 2001).



Εικόνα 9: τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού.

Για την εξάλειψη του οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητη η ύπαρξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών από τον οργανισμό. Ο οργανισμός μας είναι εφοδιασμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα από την φύση του για να αμύνεται στη δράση των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου.

1.3.2 Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους:

1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.
2. Συμβάλουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.
3. Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
4. Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μέταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
5. Δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

1.3.3 Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- Αντιοξειδωτικά ένζυμα
- Αντιοξειδωτικά μέταλλα
- Αντιοξειδωτικά από τρόφιμα

Η βασική όμως διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

1.4 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν και οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις. Η χημειοπροστασία ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Baliga et al., 2011; Kushi et al., 2012; Schwartz, 2014; Wang, Gao, & Fang, 2012).

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Camire, 2002) (Bidlack

et al. 2000; Meskin et al. 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris-Etherton et al., 2002; Marian Valko et al., 2007). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Camire, 2002)(Bidlack et al. 2000).

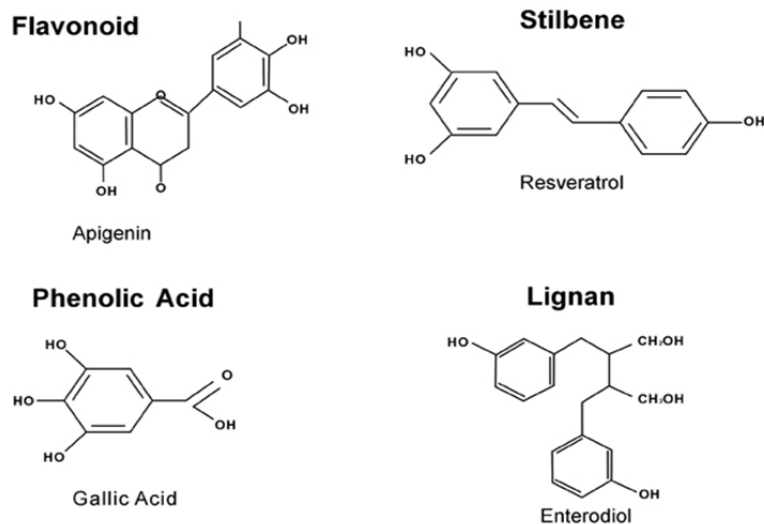
1.4.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της διαίτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011).

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Filesi, Vari, Sczzocchio, & Masella, 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

1.4.2 Χημική Δομή πολυφαινολών

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 10: Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοσυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Papadopoulou and Frazier 2004).

1.4.3 Τάξεις Πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Mennen et al., 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στους δακτυλίους τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

1.4.3.A. Φλαβονοειδή

Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτυλίους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο

του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Han, Shen, & Lou, 2007; Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004). Υπάρχουν σε κόκκινες, μπλε και μωβ αποχρώσεις και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al., 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

- **Φλαβανόλες:** Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερίκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναριγενίνη και τη ταξιφολίνη.
- **Φλαβόνες:** απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi and Nacz 1995).
- **Φλαβονόλες:** Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκετίνη, κατατάσσονται επίσης, η καμφερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004).
- **Φλαβανόνες:** βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan and Clifford 2000).

- **Ισοφλαβόνες:** βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊντζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχει την ικανότητα να μειώνει την ενδοθηλιακή σύνθεση και δράση του μονοξειδίου του αζώτου (NO•) (Wendy L. Halli 2005).
- **Ανθοκυανιδίνες:** σε αυτές οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα ολιγομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

1.4.3.B. Μη Φλαβονοειδή

Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια.

- **φαινολικά οξέα:** χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach et al., 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντικές, αντιμικροβιακές,

αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ.

- **λιγνάνες:** περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007).
- **στιλβένια:** έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυτοαλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων. Βρίσκεται και στο κόκκινο κρασί (Manach et al., 2004) για αυτό και σχετίζεται άμεσα με το «Γαλλικό παράδοξο».

1.4.4 Φυσιολογικές δράσεις των Πολυφαινολών

Στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Θεωρούνται προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα. Εμπλέκονται και σε οξειδωτικές μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog et al., 1995).

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς. Οι φυτικές πολυφαινόλες ευθύνονται για την απελευθέρωση και καταστολή των αυξητικών ορμονών (π.χ.

αυξίνη), την προστασία ενάντια στην ιονίζουσα ακτινοβολία UV, την παροχή οργανοληπτικών ιδιοτήτων που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα στο να τα καταναλώσουν, την πρόληψη από μικροβιακές λοιμώξεις (φυτοαλεξίνες) και τη συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber, Eberl, Feucht, & Polster, 2003). Επιπλέον, αποτελούν μόρια σηματοδότησης της ωρίμανσης καθώς και άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών μέσω της ρύθμισης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lattanzio, Lattanzio, Cardinali, & Amendola, 2006). Στα φρούτα και λαχανικά παρέχουν το φωτεινό χρώμα (φυτικές χρωστικές), το οποίο διευκολύνει τη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (DiCarlo, Mascolo, Izzo, & Capasso, 1999; Manach et al., 2004) (Harborne, 1986). Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (Hart & Hillis, 1974).

1.4.5 Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών

Πολλές έρευνες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών η οποία συμβαίνει, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης, μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, πολυφαινόλες δρουν:

- ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσής των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές).
- ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές OH^\bullet .
- ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Από την άλλη πλευρά, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσοεξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed&Bohn, 2010; Mennenetal., 2005; Tsao, 2010).

1.5 Τα είδη των εδώδιμων χόρτων που μελετήθηκαν

Τα ελληνικά εδώδιμα χόρτα με τα οποία ασχοληθήκαμε στη μελέτη μας φαίνονται στο παρακάτω πίνακα. Όπως παρατηρούμε τα εκχύλίσματα *Carthamus lanatus* και *Crepis sancta* προήλθαν από το βρασμό του κάθε εδώδιμου χόρτου και επεξεργάστηκαν μέσω μιας αλληλουχίας εξειδικευμένων ρητινών XAD7HP, με στόχο την απομάκρυνση της πληθώρας των σακχάρων που αυτά περιείχαν. Η συγκεκριμένη ρητίνη διαθέτει την ιδιότητα να προσροφά σχετικά πολικά συστατικά από άπολα συστήματα διαλυτών και μη αρωματικές ενώσεις από πολικά συστήματα διαλυτών. Έτσι δημιουργήθηκε ένα εκχύλισμα πλούσιο σε πολυφαινόλες, έτοιμο για ανάλυση. Επίσης η ποιοτική σύσταση του κάθε εκχυλίσματος φαίνεται στη περιγραφή. Η ποιοτική ανάλυση καθώς και η εκχύλιση και παραλαβή των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της κ. Μητάκου Σοφίας. Αμέσως μετά θα αναφερθούμε στο κάθε φυτό ξεχωριστά.

| Plant | Type of extract | Extract Code | Description |
|---|--------------------|--------------|---|
| <i>Carthamus spp.</i> (<i>Carthamus lanatus</i>) | enriched decoction | GREM_3 | Το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη και η λουτεολίνη αλλά και σε υδροξυκιναμικά οξέα όπως το χλωρογενικό |
| <i>Crepis spp.</i> (<i>Crepis sancta</i>) | enriched decoction | LAEM_3 | Το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη. |
| <i>Amaranthus blitum</i> | decoction | VEM_A1 | Βασικούς μεταβολίτες του εκχυλίσματος αποτελούν οι τριτερπενικές σαπωνίνες, ενώ είναι σχετικά πτωχό σε φαινολικές ενώσεις. |

Εικόνα 11: τα εκχύλίσματα των ελληνικών εδώδιμων χόρτων

1.5.1 *Amaranthus blitum* (VEM_A1)

Το βλήτο είναι ετήσιο φυτό της οικογένειας των αμαρανθοειδών. Η επιστημονική του ονομασία είναι *Amaranthus blitum* (Αμάραντος το βλήτον). Είναι ιθαγενές της περιοχής της Μεσογείου αλλά έχει εισαχθεί σε πολλά μέρη του κόσμου, όπως στην ανατολική Βόρεια Αμερική. Τρώγεται σε πολλά μέρη του κόσμου. Εκτιμάται ιδιαίτερος στην ελληνική κουζίνα, όπου οι βλαστοί και τα φύλλα του τρώγονται βραστά με ελαιόλαδο και λεμόνι. Συναντάται πολύ συχνά ως μικρό και θαμνώδες μονοετές φυτό της ευρύτερης περιοχής της Αρχαίας Θουρίας. Η κύρια αιτία της καλλιέργειάς του είναι το φύλλωμά αλλά και οι σπόροι του.



Εικόνα 12: *Amaranthus blitum*

Τα φύλλα τρώγονται ωμά ή μαγειρεμένα όπως το σπανάκι ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και θεραπευτικά ως αντιδιαρροϊκό, ευστόμαχο, μαλακτικό, στην αιμορραγική διάθεση, στην επούλωση φλεγμονών του δέρματος και των αιμορροΐδων, για την καταπολέμηση της κούρασης αλλά και για τη θεραπεία ηπατικών ασθενειών (Sogbohossou, 2015; Rahman et al., 2014; Long, C. L., 2004; Chopra et al., 1958; Yusuf et al., 1994). Ο χυμός από τις ρίζες χρησιμοποιείται για την ανακούφιση από πονοκεφάλους. Εκχυλίσματα του φυτού έχουν επιδείξει in vitro αντιοξειδωτική (Amin I. et al., 2006; Ozsoy N. et al., 2009), αντιφλεγμονώδη (Amornrit, W., 2015) και in vivo νεφροπροστατευτική δράση (Yilmaz-Ozden T. et al., 2016). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του φυτού τεκμηριώθηκαν μετά από σχετικές έρευνες του Πανεπιστημίου Kanpur της Ινδίας. Επίσης η αντιμικροβιακή δράση του φυτού καθώς και η δράση του ενάντια στην ελονοσία εξετάστηκε μετά από σχετικές μελέτες του Monash University of Malaysia (Hilou et al., 2006; Ancelin and Vial 1986). Τα φύλλα του φυτού φαίνονται να περιέχουν φλαβονοειδή, ταννίνες, αλκαλοειδή, στερόλες, σαπωνίνες και υδατάνθρακες ενώ οι ρίζες παρουσιάζουν την ίδια σύσταση με εξαίρεση την ύπαρξη σαπωνινών (Hunter και Fletcher, 2002). Τα

μαγειρεμένα / επεξεργασμένα φύλλα αμαράνθου είναι μια καλή πηγή βιταμίνης Α, βιταμίνης C, και φολικού οξέος. Πρόκειται για μια συμπληρωματική πηγή βιταμινών όπως η θειαμίνη, η νιασίνη και η ριβοφλαβίνη συν τα διαιτητικά ορυκτά όπως το ασβέστιο, ο σίδηρος, το κάλιο, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και το μαγγάνιο. Μαγειρεμένοι οι κόκκοι αμαράνθου είναι επίσης μια συμπληρωματική πηγή θειαμίνης, νιασίνης, ριβοφλαβίνης και φολικού, και διαιτητικών ορυκτών που αποτελούνται από ασβέστιο, σίδηρο, μαγνήσιο, φώσφορο, ψευδάργυρο, χαλκό και μαγγάνιο - συγκρίσιμοι με τους κοινούς κόκκους όπως ο σίτος, η βρώμη και άλλοι (USDA, 2011). Το *Amaranthus* μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή πρωτεΐνης, καθώς η πρωτεΐνη της δεν περιέχει γλουτένη όπως η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε κόκκους του σιταριού και της σίκαλης (Gruss et al., 2014). Επίσης η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά του *Amaranthus* είναι συγκρίσιμη με εκείνη των λαχανικών χωρίς γλουτένη και κόκκων όπως το φαγόπυρο, το καλαμπόκι, το κεχρί, το άγριο ρύζι, η βρώμη και το quinoa (Gallagher et al., 2004). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι, όπως και η βρώμη, το λάδι των σπόρων *amaranthus* μπορεί να είναι επωφελές για όσους πάσχουν από υπέρταση και καρδιαγγειακές παθήσεις, ενώ η τακτική κατανάλωση μειώνει την αρτηριακή πίεση και τη χοληστερόλη, βελτιώνοντας παράλληλα την αντιοξειδωτική άμυνα (Czerwiński et al., 2004, Martirosyan et al., 2007). Ενώ το ενεργό συστατικό της βρώμης φαίνεται να είναι οι υδατοδιαλυτές ίνες, το αμάραντο φαίνεται να μειώνει τη χοληστερόλη μέσω της περιεκτικότητάς του σε φυτικές στανόλες και σκουαλένιο (Czerwiński et al., 2004). Η καλλιέργεια αυτή έχει δυνατότητες εμπορικής εκμετάλλευσης, καθώς φαίνεται να έχει ελάχιστες απαιτήσεις διαχείρισης και το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιείται επαρκώς, ανοίγει ένα παράθυρο στην "εξειδικευμένη" αγορά αγροτών. Σύμφωνα με τη ποιοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο βρέθηκε ότι βασικοί μεταβολίτες του εκχυλίσματος αποτελούν οι τριτερπενικές σαπωνίνες ενώ είναι σχετικά φτωχό σε φαινολικές ενώσεις. (Μητάκου Σοφία, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

1.5.2 *Crepis sancta*

Το γένος *Crepis* είναι ένα γένος ετήσιων και πολυετών ανθοφόρων φυτών της οικογένειας Asteraceae που αποτελείται από 200 περίπου είδη. Η ονομασία *Crepis*

προέρχεται από την ελληνική λέξη *krepis*, που σημαίνει "παντόφλα" ή "σανδάλι" και ενδεχομένως έχει σχέση με το σχήμα του καρπού (David J. Bogler, Flora of North America). Το γένος συναντάται σε όλο το Βόρειο Ημισφαίριο και την Αφρική (Enke, N. and B. Gemeinholzer, 2008) και πολλά φυτά είναι γνωστά ως εισαγόμενα είδη σχεδόν σε όλο τον κόσμο (David J. Bogler, Flora of North America). Το κέντρο της πολυμορφίας βρίσκεται στη Μεσόγειο (Enke, N. and B. Gemeinholzer, 2008).



Εικόνα 13: *Crepis sancta*

Τα φύλλα πολλών ειδών του γένους είναι βρώσιμα και καταναλώνονται συνήθως ωμά ή βραστά ως σαλάτα (Sansanelli, S. et al., 2014; Luczaj L. et al., 2013). Στην Κρήτη, τα φύλλα του *Crepis commutata*, που ονομάζεται γλυκοσυρίδα, καταναλώνονται ωμά, βρασμένα, ατμισμένα ή καφετιά σε σαλάτες. Άλλα δύο είδη στο ίδιο νησί, το *Crepis vesicaria*, που ονομάζεται και κοκκινογούλα, λεκανίδα ή πρικούσα και μια τοπική ποικιλία που ονομάζεται μαργιές ή πικρούσες, τρώγονται βρασμένοι, τόσο τα φύλλα όσο και οι τρυφεροί βλαστοί. Τμήματα φυτών έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά ως διουρητικά, υπακτικά, αντιυπερτασικά και για την αντιμετώπιση τοπικών δερματικών λοιμώξεων (Guarrera, P. M et al., 2013; Teklehaymanot T., 2009; Mamedov N. Et al., 2004; Kültür S., 2007; Kuete, V., 2010). Επιπλέον, ορισμένα είδη του γένους *Crepis* επιδεικνύουν αντιηπατοτοξικές (Fleurentin, J. Et. Al., 1986), αντιμικροβιακές (Kuete, V., 2010), αντιοξειδωτικές, κυτοτοξικές και αντιχολινεστερασικές ιδιότητες σε *in vitro* πειράματα με εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών (Zengin, G. et al., 2015). Όσον αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται στο γένος, από τις ρίζες των φυτών έχουν απομονωθεί σεσκιτερπενικές λακτόνες (Zidorn C., 2008; Kisiel W., 1984; Kisiel W. Et al., 1995 ; Kisiel W. Et al., 1989; Kisiel W. Et al., 1996; Kisiel W. Et al., 2000) και σε μικρότερο ποσοστό φαινολικές ενώσεις, ενώ στα υπέργεια

τιμήματα κυριαρχεί η παρουσία φαινολικών και υδροξυκιναμικών οξέων όπως το κιχορικό και το καφεϋλοκινικό οξύ (Mañez S. et al., 1992; Elisa Giambanelli et al., 2017). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε επιβεβαιώθηκε ότι τα φύλλα, η ρίζα και το άνθος του *Crepis sancta*, το οποίο είναι και το είδος που μελετήσαμε εμείς, διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Okmen et al., 2015). Σύμφωνα με την ποιοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο βρέθηκε ότι το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό οξύ ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη (Μητάκου Σοφία, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

1.5.3 *Carthamus lanatus*

Το γένος *Carthamus* ανήκει στην οικογένεια των Asteraceae και αποτελείται από 15 είδη. Τα περισσότερα από αυτά απαντώνται στη λεκάνη της Μεσογείου και σε μεσογειακού τύπου κλίματα (Vilatersana R. Et al., 2005). Πρόκειται για ένα αγκαθωτό, μάλλινο φυτό, το οποίο συχνά μοιάζει να καλύπτεται από αραχνοειδές, λόγω των λεπτών μπερδεμένων ινών του.



Εικόνα 14: *Carthamus lanatus*

Εκχυλίσματα των φύλλων και των ανθέων έχουν αξιοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς κυρίως όσον αφορά την βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος, την αντιμετώπιση γυναικολογικών προβλημάτων, του έλκους στομάχου και διαφόρων τύπων λοιμώξεων (Hiramatsu M. Et. Al., 2009; Mahmood, A. Et al., 2013). Το *Carthamus lanatus* είναι ένα είδος γαϊδουράγκαθου που συνδέεται στενά με το *Carthamus tinctorius* από το οποίο λαμβάνουμε τις περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική δράση του γένους. Αυτό το ετήσιο φυτό είναι ιθαγενές της

λεκάνης της Μεσογείου, αλλά είναι γνωστό και σε άλλα μέρη όπου εισήχθη και έχει γίνει επιβλαβές ζιζάνιο, όπως σε μέρη της Βόρειας Αμερικής και της νότιας Αυστραλίας με παρόμοια κλίματα. Είναι ενδιαφέρον ότι γενικά δεν θεωρείται ζιζάνιο σε μεγάλο μέρος της Ευρώπης (Grace et al., 2002). Σε έρευνες που μελετήθηκε η δράση του συγκεκριμένου φυτού βρέθηκε ότι έχει σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση ενώ έδειξε επίσης σημαντική αναλγητική δραστηριότητα (A.Bocheva et al., 2003). Βασικούς μεταβολίτες των φύλλων και των άνθεων αποτελούν η συρινγκίνη, γλυκοσίδες και διγλυκοσίδες των φλαβονοειδών απιγενίνη, καμπερόλη, 6-υδροξυκαμπερόλη, λουτεολίνη και κερκετίνη (Fan L. et al., 2009; Jun, Y. L. et al., 2002). Ταυτόχρονα από το λάδι των σπερμάτων έχουν απομονωθεί ανάλογα σεροτονίνης που παρέχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις (Koyama N. Et al., 2006). Διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του συγκεκριμένου είδους (Taskova R. et al., 2003; Mitova M. et al., 2003). Σύμφωνα με την ποιοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο βρέθηκε ότι το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη και η λουτεολίνη αλλά και σε υδροξυκιναμικά οξέα όπως το χλωρογενικό (Μητάκου Σοφία, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης καθώς και της αναγωγικής δύναμης εκχυλισμάτων άγριων βρώσιμων φυτών/χόρτων που στάλθηκαν από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό του φαιολικού ποσοστού, στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι εξουδετέρωσης των σταθερών χημικών ριζών DPPH•, ABTS•+ και της ρίζας υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), από τις πολυφαινολικές ενώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων, και τέλος η μέθοδος αναγωγής του Fe^{+3} (Reducing Power Assay).

Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκε η χημειοπροστατευτική (αντιμεταλλαξιγόνος) δράση των εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων που προκαλούνται από ρίζες περοξυλίου (ROO^{\bullet}), οι οποίες παράχθηκαν από την θερμική διάσπαση του 2,2 -azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH).

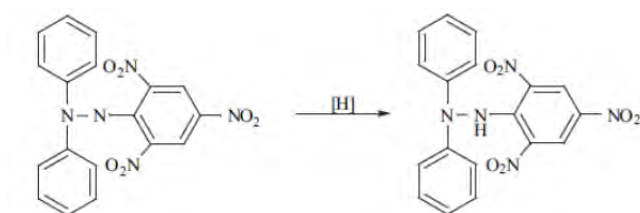
Στην συνέχεια, στο φυτικό εκχύλισμα που παρουσίασε την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και τη μεγαλύτερη αναγωγική δράση, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της επίδρασης του στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών επιμύου. Χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορίσαμε δείκτες οξειδωτικού στρες για να εξετάσουμε εάν το φυτικό αυτό εκχύλισμα παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και αν ναι, σε ποια τιμή συγκεντρώσεώς της.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

3.1.α. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλιδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλιδραζύλιο (DPPH•) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλιδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλιδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 16). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 15: Η αναγωγή του DPPH• σε DPPH:H

3.1.β. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH• την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH•) και ακολουθεί η προετοιμασία των

διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης) (900 μL), 100 μM ρίζας DPPH \cdot (50 μL) και το εκχύλισμα των φυτών (50 μL) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Επίσης, ελέγχθηκε αν το εκχύλισμα απορροφούσε στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 517 nm μετρώντας την απορρόφηση κάθε συγκέντρωσης σε μεθανόλη (πίνακας 4). Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα.

Η συγκέντρωση (100 μM) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH \cdot (5, 10, 20, 40, 80, 100 μM) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μM βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσής της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα.

Πίνακας 3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

| | Τυφλό | Control | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| Εκχύλισμα | - | - | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50μl |
| Μεθανόλη | 950 μl | 900 μl | 900 μl | 900 μl | 900 μl | 900 μl | 900μl |
| DPPH\cdot | - | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50μl |
| V τελ | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml |

Πίνακας 4: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

| | Τυφλό | Control | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| Εκχύλισμα | - | - | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50μl |
| Μεθανόλη | 950 μl | 900 μl | 950 μl | 950 μl | 950 μl | 950 μl | 950μl |
| V τελ | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml |

3.1.γ. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_s : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

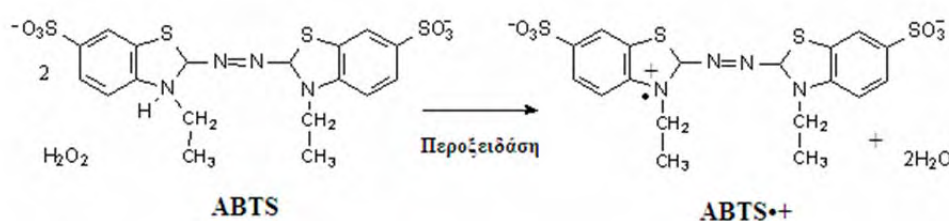
Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

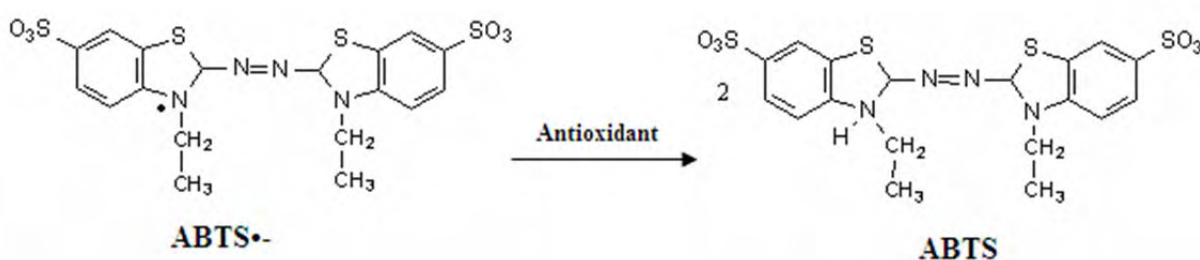
3.2.α. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Η ρίζα του ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP)

παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας (Εικόνα 14) και στην συνέχεια να ακολουθήσει η επώαση με την προς εξέταση ουσία. Η ρίζα του $\text{ABTS}^{\bullet+}$ είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα του $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται (Εικόνα 15).



Εικόνα 16: Παραγωγή της ρίζας του $\text{ABTS}^{\bullet+}$ μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H_2O_2



Εικόνα 17: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Διαλύματα

ABTS (1 mM τελική συγκέντρωση)

ABTS MW: 548.68

Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μL) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε στο H_2O . Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο.

20ml H₂O + 21.94mg ABTS

H₂O₂ (30 μM τελική συγκέντρωση)

Για τελική συγκέντρωση H₂O₂ 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μL) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8.8 M αραιώνουμε με H₂O ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM.

Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί την ημέρα του πειράματος είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο.

1^η αραιώση 1/100 10ul stock 30% + 990ul H₂O

2^η αραιώση 1/146 68ul (1) + 9860ul H₂O

HRP

-Ένζυμο (Sigma cat. no. 125K7415).

-Διαλύουμε 1mg σε 10ml αποστειρωμένο νερό.

-Κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση (π.χ. 100ul stock + 1900ul H₂O).

-Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο.

3.2.β. Πειραματικό πρωτόκολλο

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας, η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικά erppendorf 1,5 ml, σε όγκο 1 ml στο οποίο εμπεριέχονται ABTS 1 mM, H₂O₂ 30 μM και HRP 6 μM. Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά που παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις (π.χ. 0,5, 1, 5 mg/ml) όπως φαίνεται στον πίνακα. Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Πίνακας 5: Πίνακας σειράς προσθήκης διαλυμάτων

| 3x | Blank | Control | 1(C ₁) | 2(C ₂) | 3(C ₃) | 4(C ₄) | 5(C ₅) |
|-----------------------------------|--------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| H₂O | 450 μL | 400 μL | 400 μL | 400 μL | 400 μL | 400 μL | 400 μL |
| ABTS | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| H₂O₂ | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL |
| HRP | - | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL |
| Βτελ | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Εκχύλισμα | - | - | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL |

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

Πίνακας 6: Πίνακας προσθήκης διαλυμάτων καμπύλη ουσίας

| 3x | Blank | 1(C ₁) | 2(C ₂) | 3(C ₃) | 4(C ₄) | 5(C ₅) |
|-----------------------------------|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| H₂O | 450 μL | 450 μL | 450 μL | 450 μL | 450 μL | 450 μL |
| ABTS | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| H₂O₂ | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL | 50 μL |
| Βτελ | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Εκχύλισμα | - | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL |

3.2.γ. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\% RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Όπου RSC (radical scavenging capacity), και απορρόφηση control είναι η απορρόφηση της ρίζας μόνη της.

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά

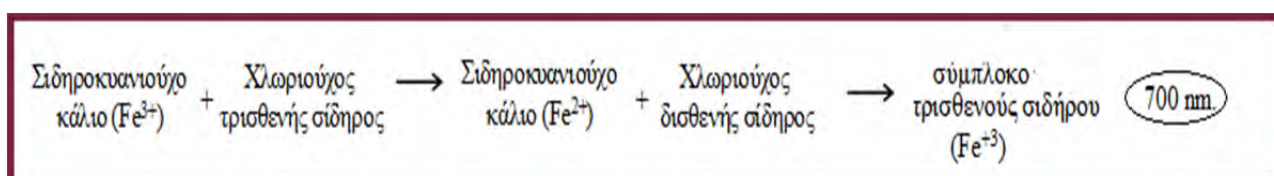
50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Reducing power (RPA)

Η αναγωγική δύναμη διαφόρων ουσιών προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994). Η μέθοδος αυτή σχετίζεται με την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μιας ουσίας και μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων δειγμάτων. Ενώσεις με ισχυρή αναγωγική δύναμη είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα μόρια, που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σε αυτή τη δοκιμασία, το κίτρινο χρώμα του υπό μελέτη διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της κάθε εξεταζόμενης ουσίας. Παρουσία αναγωγικού περιβάλλοντος προκαλείται μετατροπή του συμπλόκου Fe⁺³/σιδηροκυανιούχο κάλιο στην ανηγμένη μορφή του σιδήρου (Fe⁺²). Με τη μέτρηση του σχηματισμού του κυανού χρώματος (Pearl's Prussian blue) στα 700 nm είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ιόντος Fe⁺³.

3.3.a. Αρχή της Μεθόδου

Ουσίες με αναγωγική ισχύ αντιδρούν με το σιδηροκυανιούχο κάλιο (C₆N₆FeK₃) (που περιέχει Fe⁺³) και το ανάγουν σε ανηγμένο σιδηροκυανιούχο κάλιο (C₆N₆FeK₄) (που περιέχει Fe⁺²), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με χλωριούχο σίδηρο και το μετατρέπει σε ένα σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου (Fe⁺³). Αυτό το προϊόν που σχηματίζεται έχει κυανό χρώμα και φωτομετρείται στα 700 nm. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί και η συγκέντρωση του ιόντος Fe⁺³.



Παρασκευή Διαλυμάτων

1) Ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά και νάτριο (Sodium Phosphate buffer) 0.2M, pH 6.6

Για να φτιάξουμε το διάλυμα αυτό, διαλύουμε 13,9g δισόξινου φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate monobasic, NaH_2PO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού και 26.825 g όξινου φωσφορικού δινατρίου (sodium phosphate dibasic heptahydrate, Na_2HPO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια προσθέτουμε 62,5 ml του πρώτου διαλύματος και 37,5 ml του δεύτερου διαλύματος σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6.6.

2) Σιδηροκυανιούχο κάλιο (Potassium ferric cyanide, $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$, 1% w/v)

Διαλύουμε 0,1 g $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

3) Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος (Ferric chloride, FeCl_3 , 1% w/v)

Διαλύουμε 0,01g FeCl_3 σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

4) Τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA, 10% w/v)

Προσθέτουμε 10 ml από ένα πυκνό διάλυμα TCA περιεκτικότητας 100% σε 90 ml απιονισμένου νερού.

3.3.β. Πειραματική Διαδικασία

1. Διαλύουμε το δείγμα μας στο ρυθμιστικό διάλυμα (0,2 M, pH 6,6).
2. Προσθέτουμε 250 μl από το διάλυμα του δείγματος μας σε 250 μl σιδηροκυανιούχου καλίου 1%.
3. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά.
4. Κρυνώνουμε τα δείγματά μας και προσθέτουμε 250 μl TCA 10%.
5. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 λεπτά.
6. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (250 μl) και προσθέτουμε 250 μl απιονισμένου νερού και 500 μl χλωριούχου τρισθενούς σιδήρου 0,1%.
7. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούμε στα 700 nm.

Οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

Πίνακας 7: Πίνακας σειράς προσθήκης διαλυμάτων

| 3X | Τυφλό (Blank) | Δείγμα ελέγχου (Control) | Δείγμα 1 | Δείγμα 2 | Δείγμα 3 |
|---|------------------|-----------------------------|----------|----------|----------|
| Χυμός | - | - | 250μl | 250μl | 250μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (0,2M,pH 6.6) | 500 μl | 250μl | 250μl | 250μl | 250μl |
| Σιδηροκυανιούχο κάλιο | - | 250μl | 250μl | 250μl | 250μl |
| Επώαση στους 50 °C για 20 λεπτά | | | | | |
| TCA | 250μl | 250μl | 250μl | 250μl | 250μl |
| Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά | | | | | |
| dH ₂ O | 250μl | 250μl | 250μl | 250μl | 250μl |
| Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl |

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 700 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του σιδηροκυανιούχου καλίου.

Πίνακας 8: πίνακας προσθήκης διαλυμάτων

| 3X | Δείγμα 1 | Δείγμα 2 | Δείγμα 3 |
|---|----------|----------|----------|
| Δείγμα | 250μl | 250μl | 250μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (0,2M,pH 6.6) | 250μl | 250μl | 250μl |
| TCA | 250μl | 250μl | 250μl |
| Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά | | | |
| dH ₂ O | 250μl | 250μl | 250μl |
| Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος | 50μl | 50μl | 50μl |

3.3.γ. Υπολογισμοί

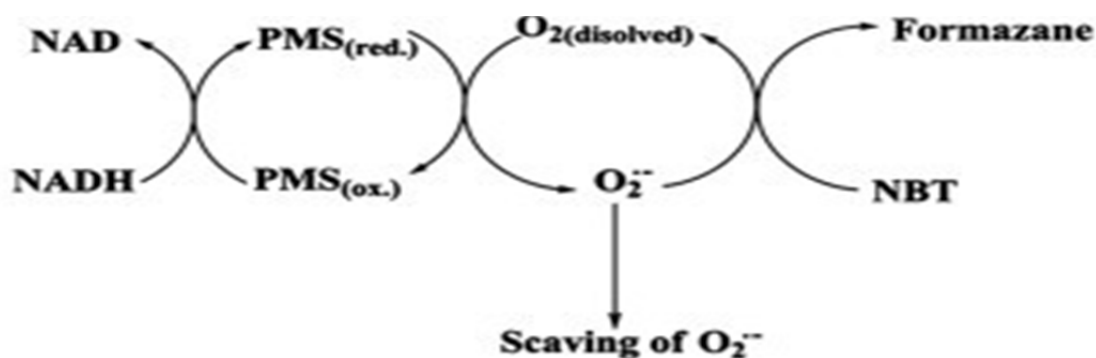
Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί (0.5AU) απορρόφηση 0,5.

3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$ (Superoxide radical scavenging activity)

3.4.α. Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004.

Η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\cdot-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT (Εικόνα 16).



Εικόνα 18: Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) μέσω του συστήματος μεθοσουλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμιδο αδενινονουκλεοτίδιο (NADH).

3.4.β. Πειραματική διαδικασία

Πιο αναλυτικά, σε 2,5 ml Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προστίθενται 500 μ l NBT (300 μ M), 500 μ l NADH (468 μ M) και 250 μ l πρωτεΐνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 500 μ l PMS (60 μ M). Τα

δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Η απορρόφηση μετράται στα 560 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν PMS (60μM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

3.4.γ. Υπολογισμοί

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot -}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_d) / A_o \times 100$$

A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560 nm

A_d: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560 nm

3.5 Ολικά Πολυφαινολικά -Folin ciocalteu

3.5.α Αρχή της μεθόδου

Η ανάλυση πολυφαινολικού ποσοτικού προσδιορισμού βασίζεται στη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο φαινόλης Folin–Ciocalteu (FC) είναι ένα μίγμα φωσφορομολυβδαινικού και φωσφονικού άλατος που χρησιμοποιείται για τη *in vitro* χρωματομετρική δοκιμασία φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών. Το αντιδραστήριο φαινόλης Folin & Ciocalteu δεν περιέχει φαινόλη, αντίθετα, το αντιδραστήριο θα αντιδράσει με φαινόλες και μη φαινολικές αναγωγικές ουσίες για να σχηματίσουν χρωμογόνα που μπορούν να ανιχνευθούν φασματοφωτομετρικά. Η ανάλυση F-C βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων σε αλκαλικό μέσο από τις φαινολικές ενώσεις σε φωσφομολυβδικά όξινα σύμπλοκα για να σχηματίσουν μπλε σύμπλοκα που καθορίζονται φασματοφωτομετρικά στα 765 nm. Το μπλε χρωμοφόρο που σχηματίζεται αποτελείται από άλατα φωσφοβολφραμικού / φωσφορολυβδαινίου και η μέγιστη απορρόφηση εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιείται ως πρότυπη ένωση αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλακτικού οξέος.

3.5.β. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά διαλύουμε 25g Na_2CO_3 σε 10ml H_2O . Στη συνέχεια προσθέτουμε τα αντιδραστήρια με σειρά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent (FCR)).

| | Δείγμα (3X) | Δείγμα χωρίς FC (2X) | Τυφλό |
|-------------------------------------|-------------|----------------------|---------|
| H₂O | 1000 μl | 1100 μl | 1200 μl |
| Folin | 100 μl | - | 100 μl |
| Δείγμα | 20 μl | 20 μl | - |
| Επώαση 3 min | | | |
| Na₂CO₃ | 280 μl | 280 μl | 280 μl |
| H₂O | 600 μl | 600 μl | 600 μl |
| Επώαση 45 min | | | |

3.6 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

3.6.1. Γενικά

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων. Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκε η ρίζα περοξυλίου (ROO[•]).

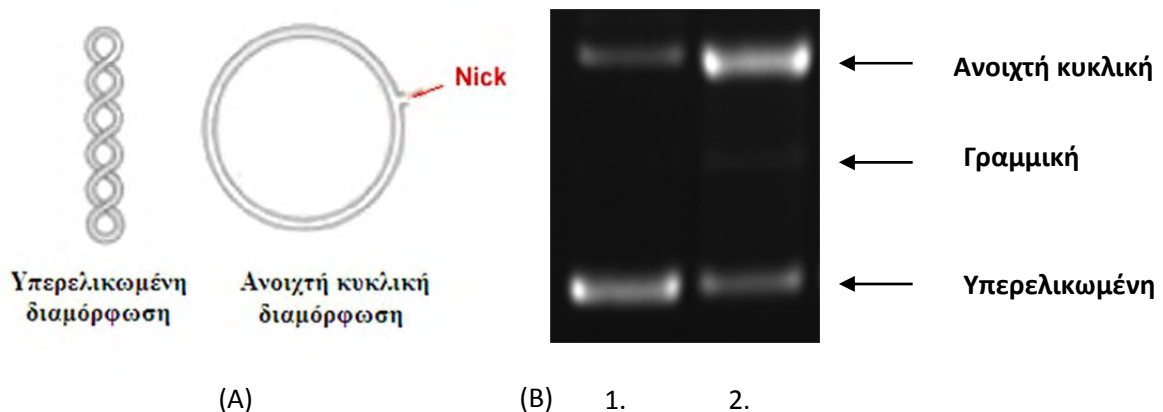
Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 19).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν

υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.

- Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 19: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

(A) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks).

(B) Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

Σειρά 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα.

Σειρά 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην

παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

3.6.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων E. Coli που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 µg/mL αμικικίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων E. Coli που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο (100 mL). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαλυθεί το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα

προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL. Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech . Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

3.6.3. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

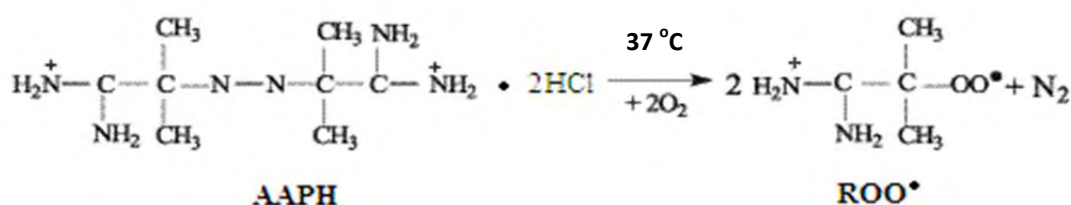
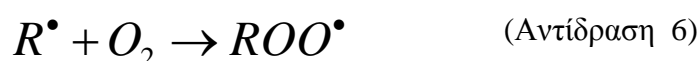
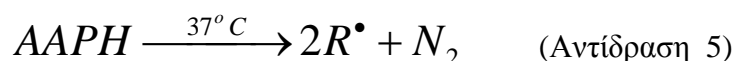
3.6.3.α. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001).

Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που

συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξείδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO^\bullet χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία $37^\circ C$ διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO^\bullet .



Εικόνα 20: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO^\bullet .

Οι ρίζες ROO^\bullet έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO^\bullet .

3.6.3.β. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 g αгарόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.
- **AAPH 15 mM**: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM . Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε πέντε συγκεντρώσεις.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικομένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 11. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (Εικόνα 19).

Πίνακας 10: Ποσότητες αντιδραστηρίων

| | PBS | Αντιοξειδωτικός παράγοντας | DNA plasmid | AAPH |
|---------------------|-----------|----------------------------|-------------|-----------|
| Control (-) | 8 μ l | - | 2 μ l | - |
| AAPH 15mM (+) | 4 μ l | - | 2 μ l | 4 μ l |
| Εκχ. C ₁ | 1 μ l | 3 μ l | 2 μ l | 4 μ l |
| Εκχ. C ₂ | 1 μ l | 3 μ l | 2 μ l | 4 μ l |
| Εκχ. C ₃ | 1 μ l | 3 μ l | 2 μ l | 4 μ l |
| Εκχ. C ₄ | 1 μ l | 3 μ l | 2 μ l | 4 μ l |
| Εκχ. C ₅ | 1 μ l | 3 μ l | 2 μ l | 4 μ l |
| Εκχ. C ₁ | 5 μ l | 3 μ l | 2 μ l | - |



Εικόνα 21: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin

Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μ l διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) (Εικόνα 22) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8% w/v στα 70 V για 60 min (Εικόνες 23 και 24). Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel χρωματίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μ g/ml) για 30 min και ακολούθουσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της

Alpha Innotech (Εικόνα 25). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

3.6.3.γ. Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^\bullet , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

Όπου:

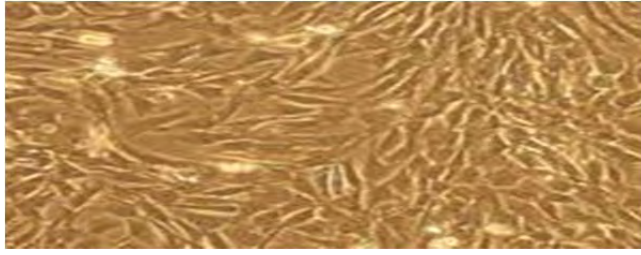
- S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,
 S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και
 S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{X}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

3.7. ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Μυϊκά κύτταρα C2C12

Τα μυϊκά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιιεργήθηκαν από πλατύ μυ ποντικών μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών. Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 22: C₂C₁₂ κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων C2C12 είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:

- ✓ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gilbo BRL 41966)
- ✓ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- ✓ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
- ✓ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα:

α) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25mlFBS
- 2,5ml pen/str
- 2,5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της προσθήκης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 2,5ml pen/str
- 2,5ml Γλουταμίνη

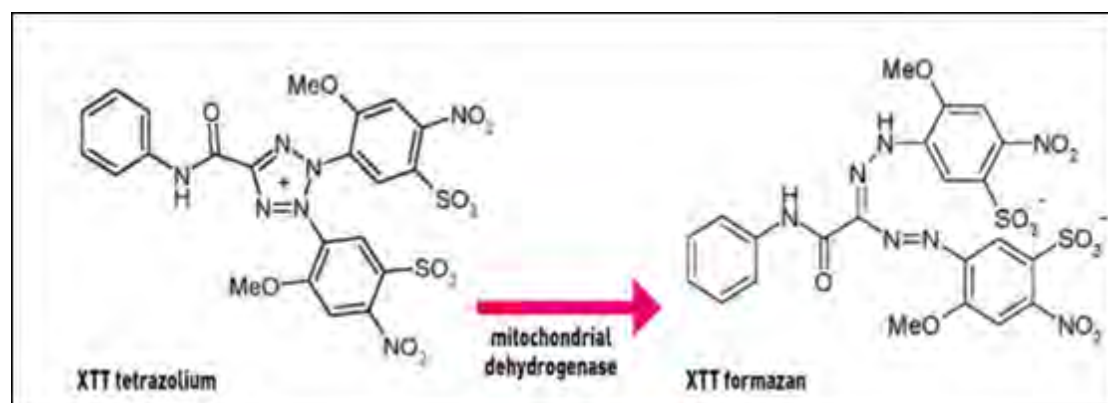
3.7.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)

Οι μυοβλάστες αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100 µg/ml)] και σε επώαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 µL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναίωρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόνταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.7.2 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT

α. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του φυτικού εκχυλίσματος στους μυοβλάστες χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζίνη. Η φορμαζίνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 23: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζίνη από ζωντανά κύτταρα

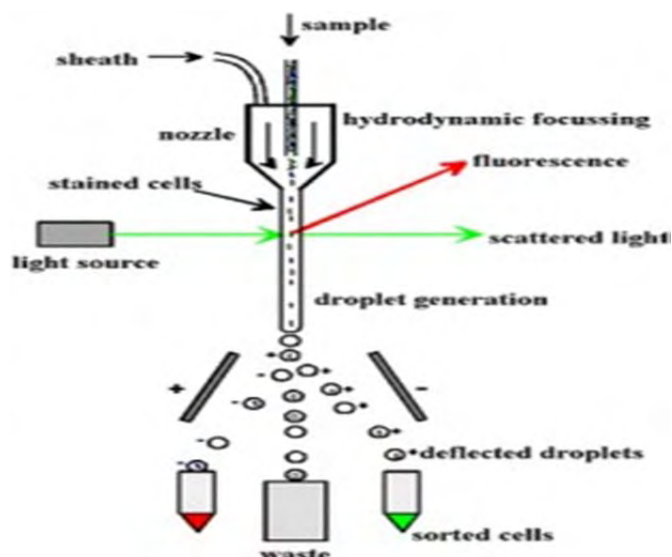
β. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθονταν 5000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα γινόταν προσθήκη θρεπτικού υλικού με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τα βιοδραστικά συστατικά) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση γινόταν προσθήκη 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν την πρωτεΐνη και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της πρωτεΐνης έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των μυοβλαστών C2C12 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

3.7.3 Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμπουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 24: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα προς ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με ακτίνες laser κατάλληλης για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να

χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.



Εικόνα 25: Κυτταρόμετρο ροής

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ολικά Φαινολικά και Ολικά Φλαβονοειδή -Follin ciocalteau

Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας με τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ και έχουν εκφραστεί σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.

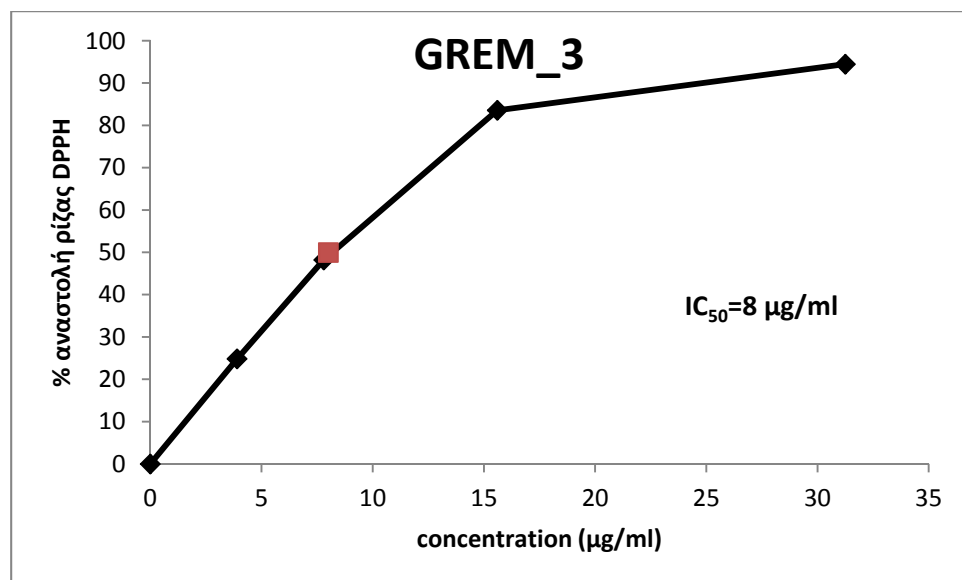
Πίνακας 11: ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο

| Φυτικά εκχυλίσματα | mg GAE/g extract |
|--------------------|------------------|
| VEM_A1 | 62,66 |
| GREM_3 | 408,04 |
| LAEM_3 | 288 |

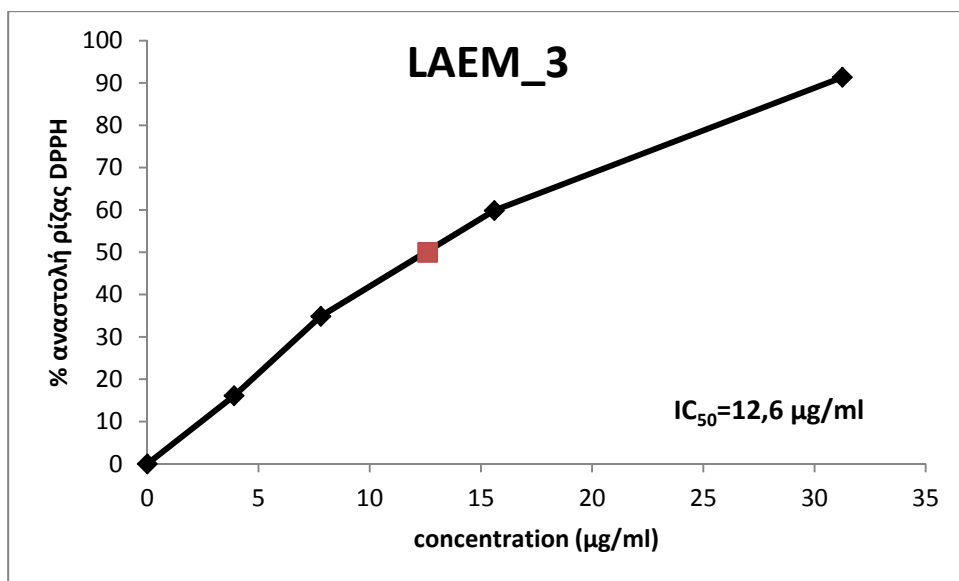
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

Συνολικά μελετήθηκαν τρία φυτικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα VEM_A1, GREM_3, LAEM_3 εξετάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μg/ml).

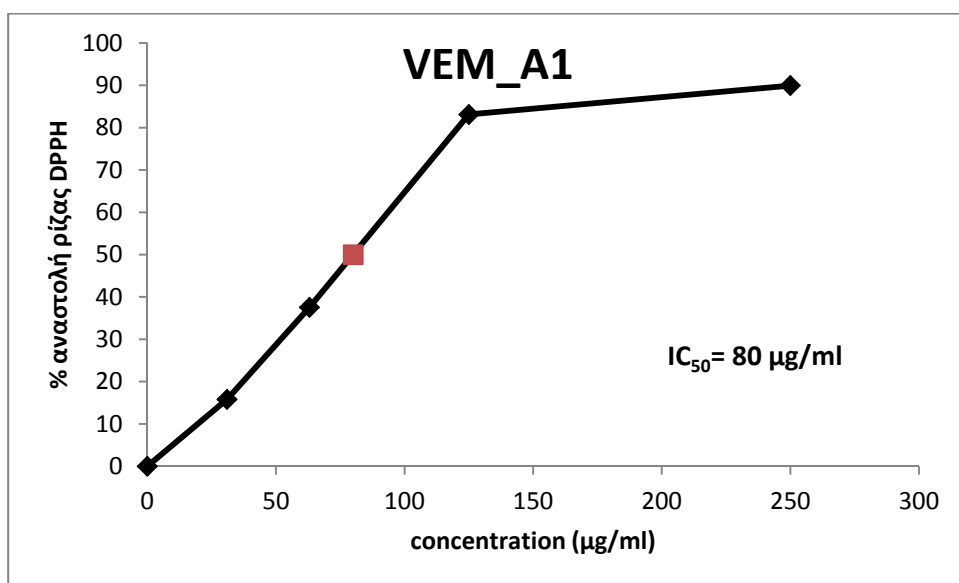
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 1: Η % αναστολή της ρίζας DPPH• από το εδώδιμο χόρτο GREM_3.



Διάγραμμα 2: Η % αναστολή της ρίζας DPPH από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3



Διάγραμμα 3: Η % αναστολή της ρίζας DPPH από το εδώδιμο χόρτο VEM_A1

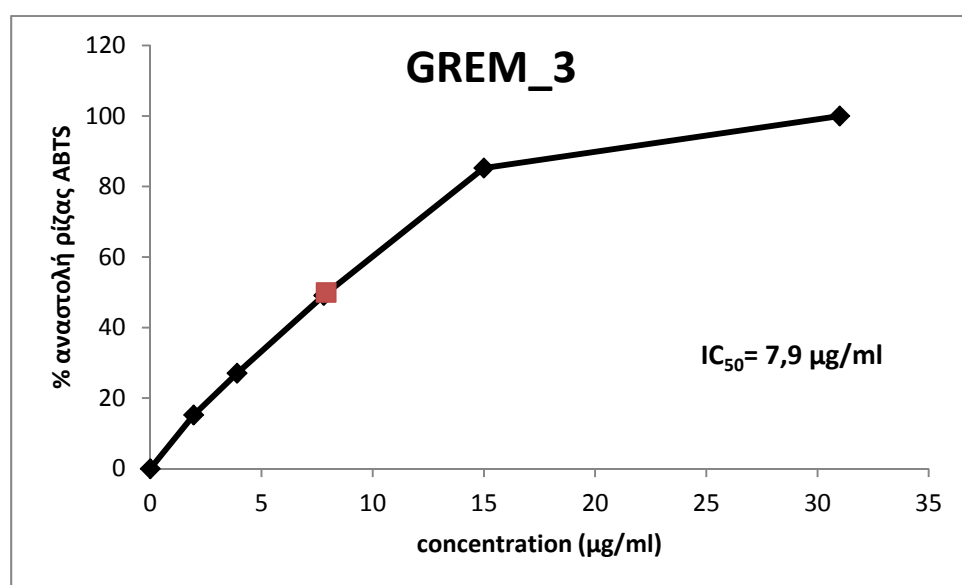
Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα και των τριών φυτικών εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH*. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 10,5 έως 74 mg/μl. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Carthamus lanatus* με IC_{50} ίσο με 8μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Amaranthus blitum* με IC_{50} ίσο με 80 μg/ml.

Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Άρα σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, αφού την μικρότερη συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της ρίζας DPPH• παρουσιάζει το φυτικό εκχύλισμα *Carhamus lanatus* με τη μικρότερη τιμή IC_{50} , ίση με 8μg/ml, αυτό σημαίνει ότι αυτό το εκχύλισμα έχει την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• σε σχέση με τα άλλα δύο αφεψήματα.

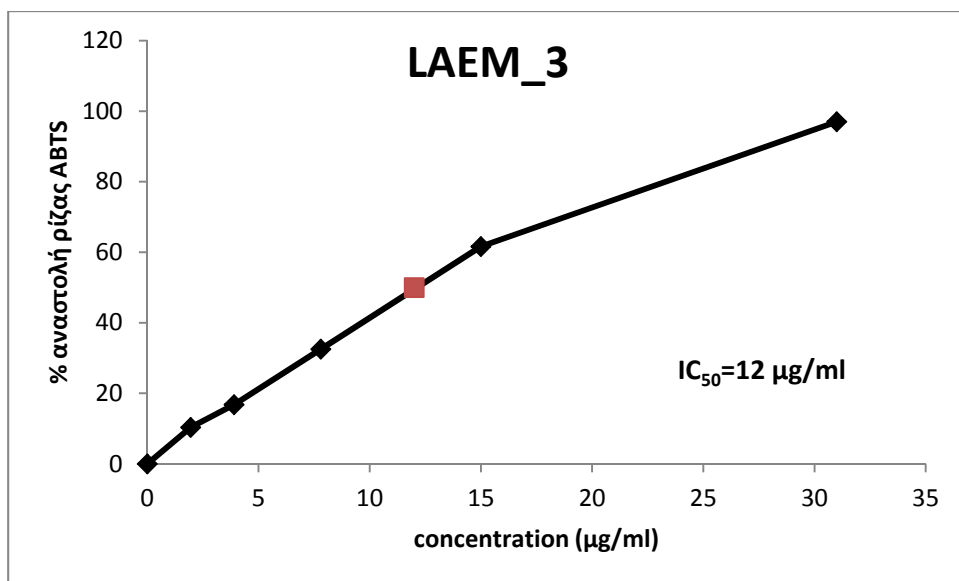
4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}

Συνολικά μελετήθηκαν τρία φυτικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα VEM_A1, GREM_3, LAEM_3 εξετάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μg/ml).

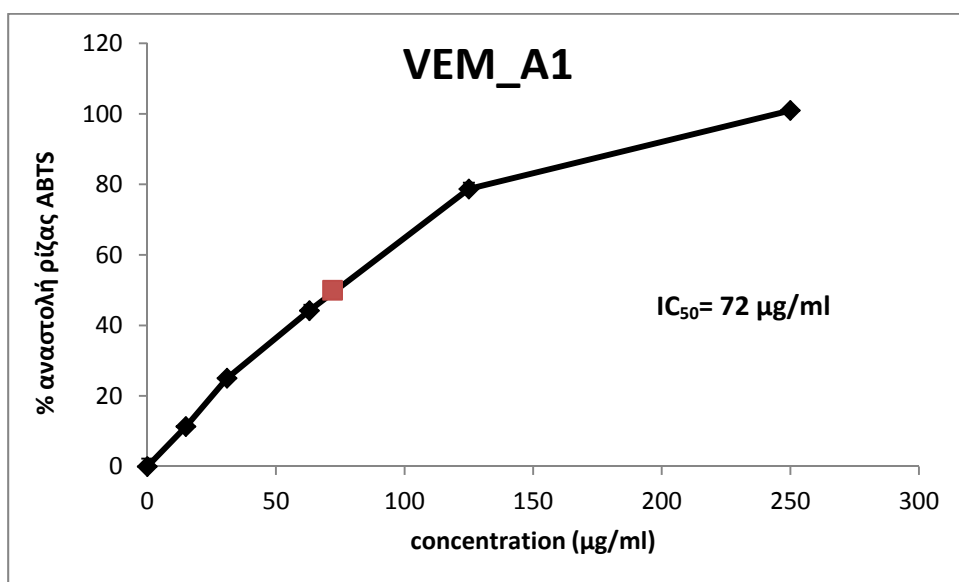
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από τα τρία φυτικά εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 4: Η % αναστολή της ρίζας ABTS από το εδώδιμο χόρτο GREM_3.



Διάγραμμα 5: Η % αναστολή της ρίζας ABTS από το εκδόσιμο χόρτο LAEM_3.



Διάγραμμα 6: Η % αναστολή της ρίζας ABTS από το εκδόσιμο χόρτο VEM_A1

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα και των τριών φυτικών εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν τη ρίζα $ABTS^{*+}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 7,9 έως 72 mg/µl. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Carthamus lanatus* με IC_{50} ίσο με 7,9 µg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Amaranthus blitum* με IC_{50} ίσο με 72µg/ml.

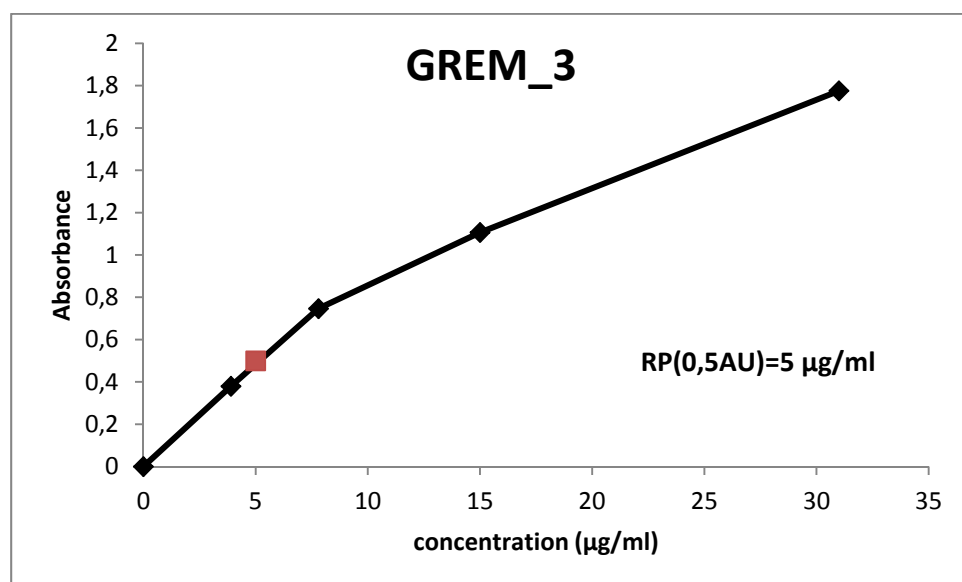
Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας $ABTS^{*+}$ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Άρα σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, αφού την μικρότερη συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της ρίζας $ABTS^{*+}$ παρουσιάζει το φυτικό

εκχύλισμα *Carthamus lanatus* με τη μικρότερη τιμή IC_{50} , ίση με 7,9 $\mu\text{g/ml}$, αυτό σημαίνει ότι το εκχύλισμα αυτό έχει την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $ABTS^{*+}$ σε σχέση με τα άλλα αφενήματα.

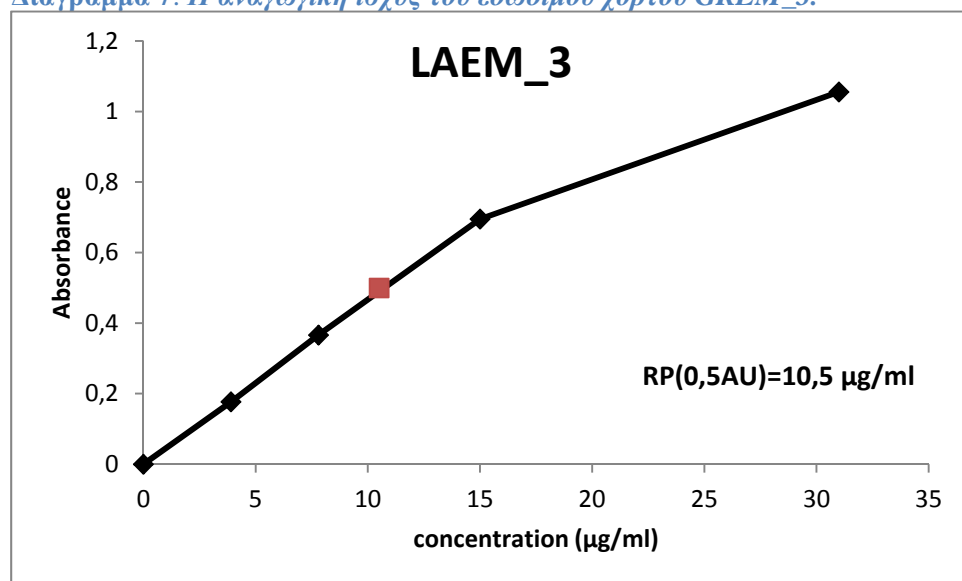
4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER (RPA)

Συνολικά μελετήθηκαν τρία φυτικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα VEM_A1, GREM_3, LAEM_3 εξετάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ($\mu\text{g/ml}$).

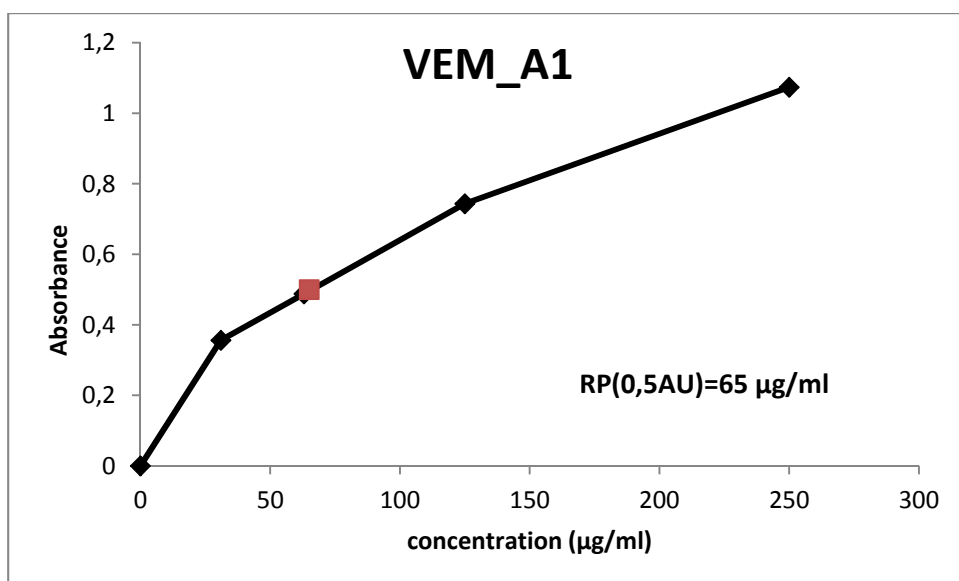
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την αναγωγική ισχύ των τριών φυτικών εκχυλισμάτων.



Διάγραμμα 7: Η αναγωγική ισχύς του εδώδιμου χόρτου GREM_3.



Διάγραμμα 8: Η αναγωγική ισχύς του εδώδιμου χόρτου LAEM_3.



Διάγραμμα 9: Η αναγωγική ισχύς του εδώδιμου χόρτου VEM_A1.

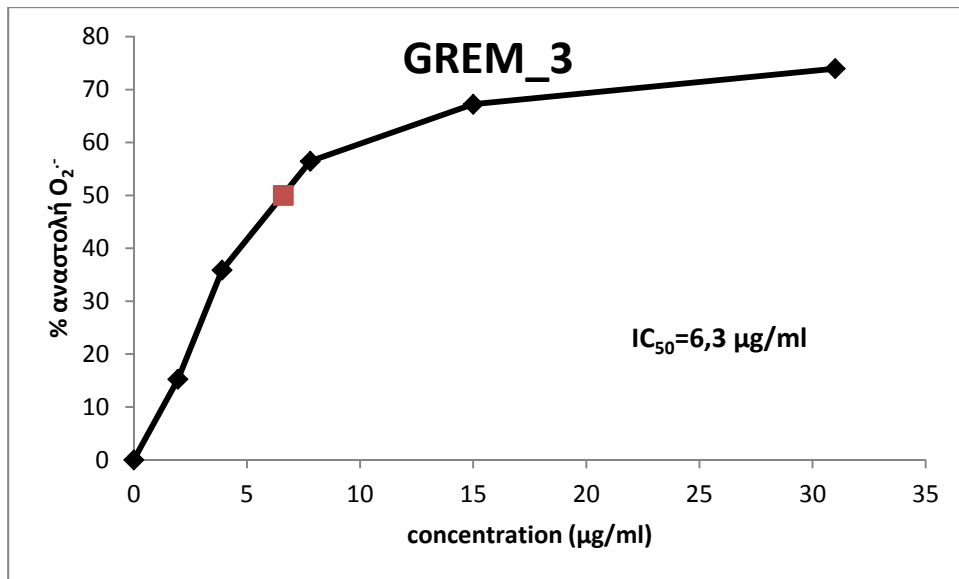
Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί απορρόφηση 0,5. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική αναγωγική δύναμη. Το εύρος των τιμών $RP(0,5AU)$ κυμαινόταν από 5 έως 65 mg/μl . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Carthamus lanatus* με $RP(0,5AU)$ ίσο με 5 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Amaranthus blitum* με $RP(0,5AU)$ ίσο με 65 μg/ml .

Όσο πιο μικρή συγκέντρωση του φυτικού εκχυλίσματος που προκαλεί απορρόφηση 0,5 τόσο πιο μεγάλη είναι η αναγωγική του ισχύς και άρα τόσο πιο δραστικό είναι όσον αφορά την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών (μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση). Στην συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα *Carthamus lanatus* είναι αυτό με την ισχυρότερη αναγωγική ισχύ ενώ το δείγμα *Amaranthus blitum* παρουσίασε την ασθενέστερη αναγωγική ισχύ.

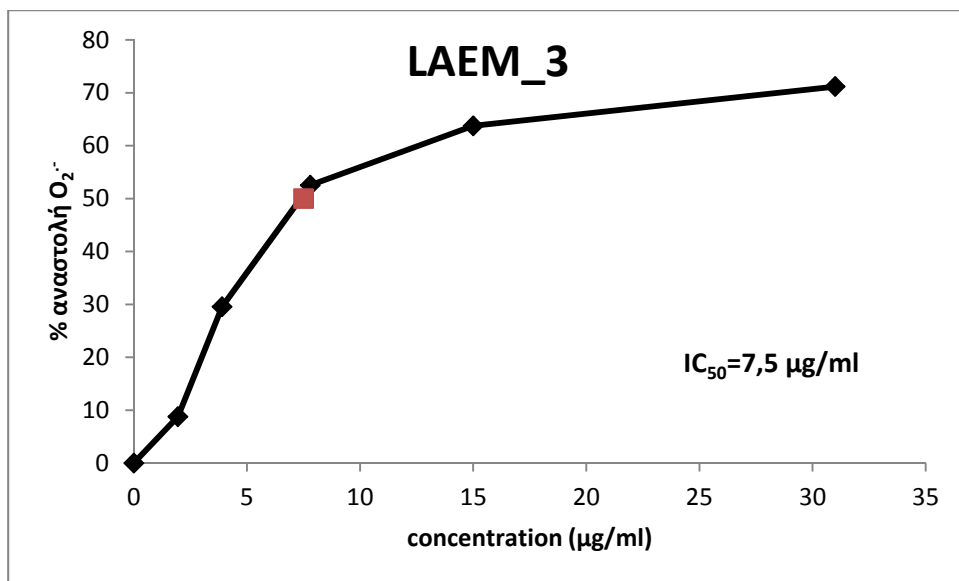
4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{-•} (Superoxide radical scavenging activity)

Συνολικά μελετήθηκαν τρία φυτικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα VEM_A1, GREM_3, LAEM_3 εξετάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μg/ml).

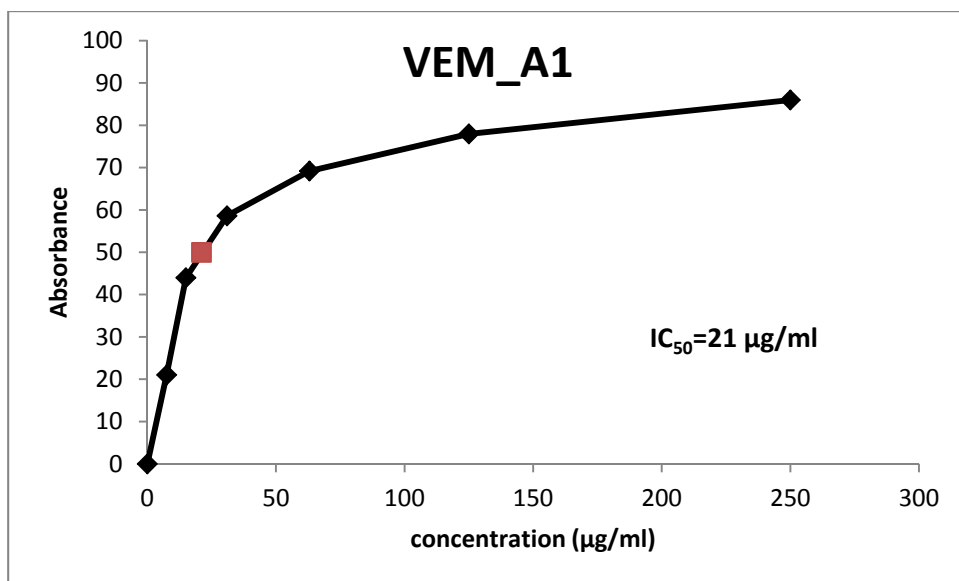
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % εξουδετέρωση της ρίζας O₂^{-•} από τα φυτικά εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 10: Η % αναστολή της ρίζας O_2 από το εδώδιμο χόρτο GREM_3.



Διάγραμμα 11: Η % αναστολή της ρίζας O_2 από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3.



Διάγραμμα 12: Η % αναστολή της ρίζας O₂^{-•} από το edώδιμο χόρτο VEM_A1.

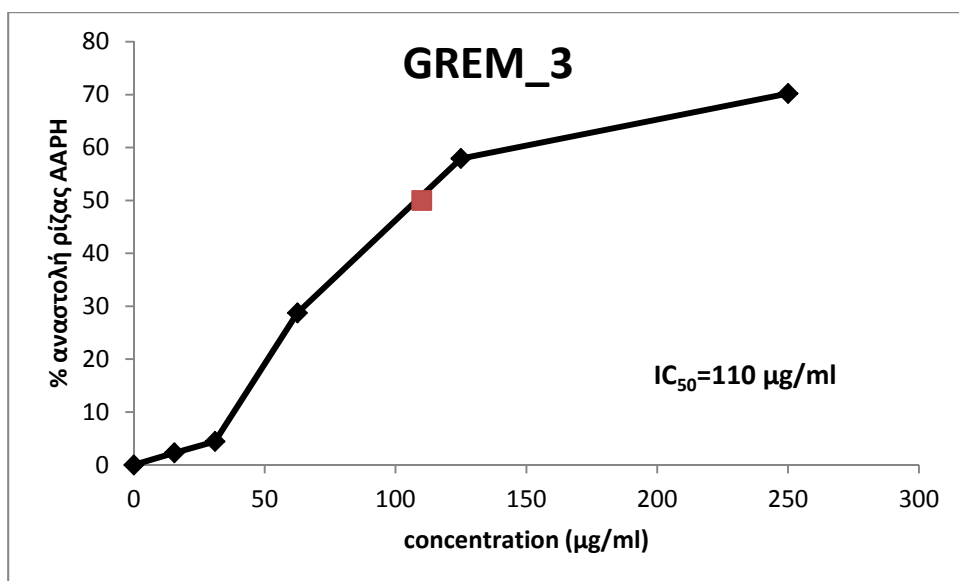
Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα των τριών φυτικών εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν τη ρίζα O₂^{-•}. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 6,3 έως 21 mg/μl . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Carthamus lanatus* με IC₅₀ ίσο με 6,3 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος *Amaranthus blitum* με IC₅₀ ίσο με 21 μg/ml .

Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας O₂^{-•} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Άρα σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, αφού την μικρότερη συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της ρίζας O₂^{-•} παρουσιάζει το φυτικό εκχύλισμα *Carthamus lanatus* με τη μικρότερη τιμή IC₅₀, ίση με 6,3 μg/ml, αυτό σημαίνει ότι το εκχύλισμα αυτό έχει την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{-•} σε σχέση με τα άλλα.

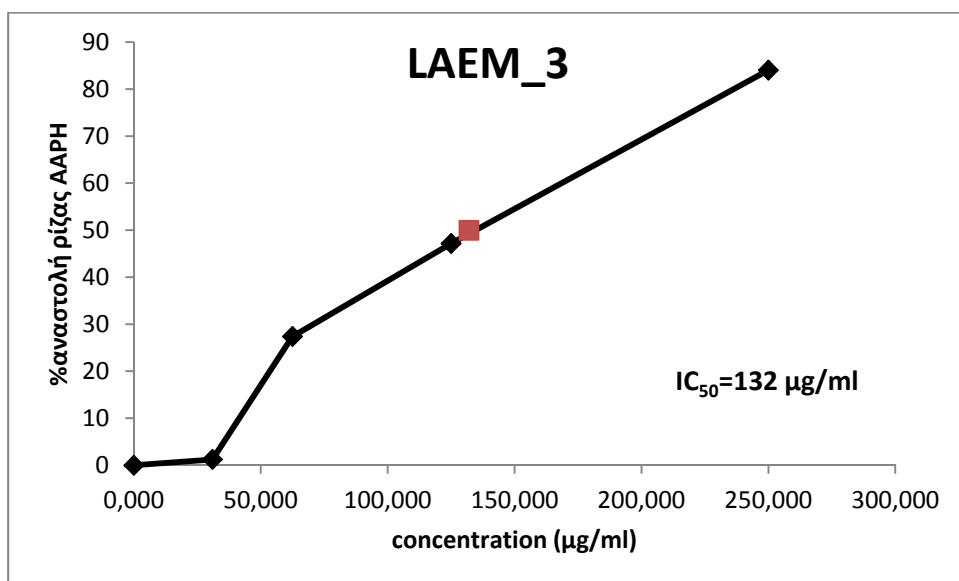
4.6 Αποτελέσματα της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα AAPH και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

Συνολικά μελετήθηκαν τρία φυτικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα VEM_A1, GREM_3, LAEM_3 εξετάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μg/ml):

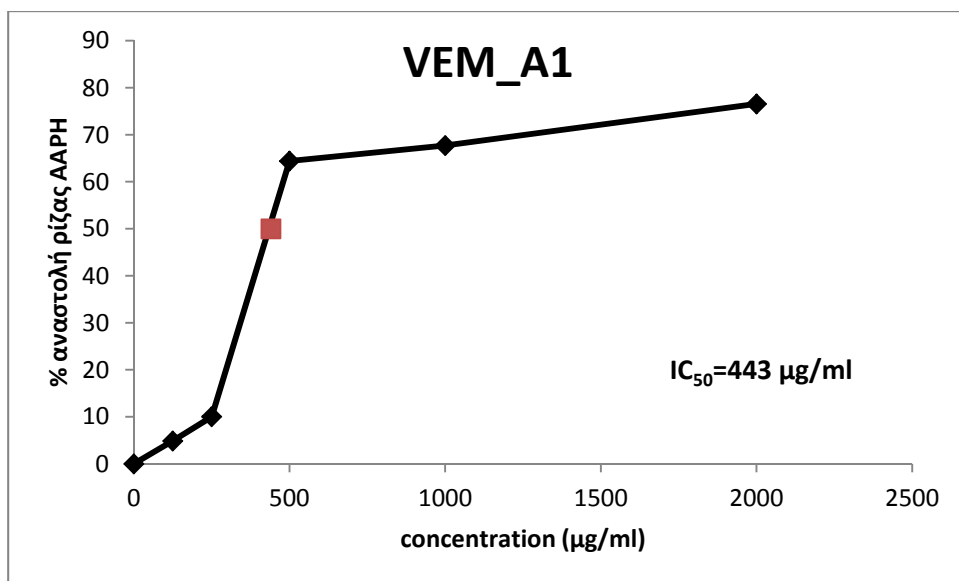
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή της επαγωγής θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα AAPH•.



Διάγραμμα 13: Η % αναστολή της ρίζας AAPH από το εδώδιμο χόρτο GREM_3.



Διάγραμμα 14: Η % αναστολή της ρίζας AAPH από το εδώδιμο χόρτο LAEM_3.



Διάγραμμα 15: Η % αναστολή της ρίζας AAPH από το εδώδιμο χόρτο VEM_A1.

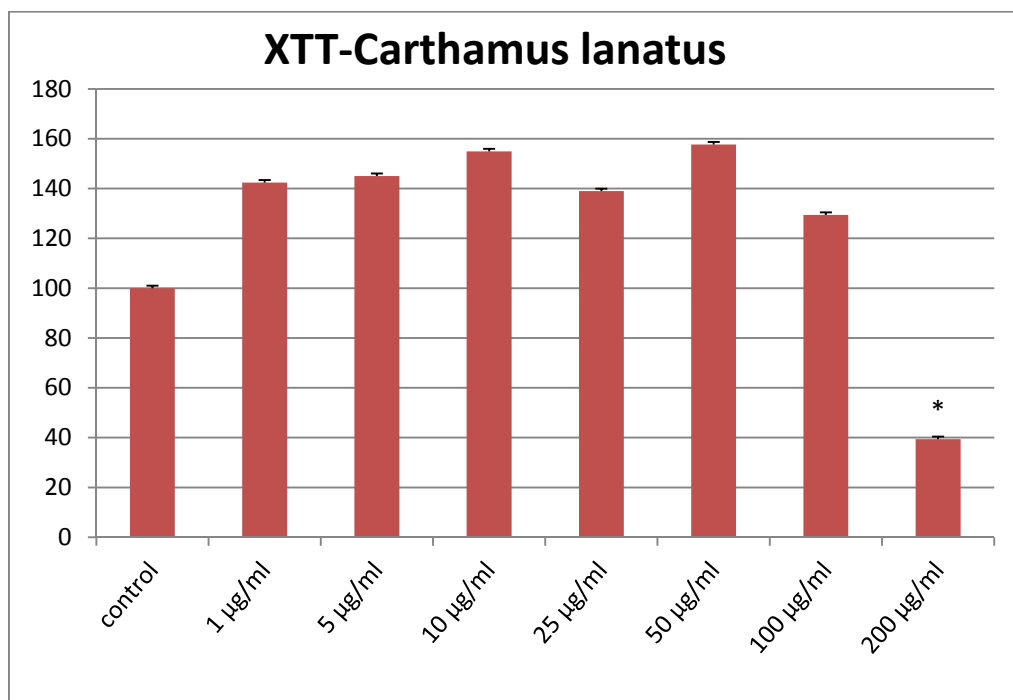
Και τα τρία φυτικά εκχύλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα AAPH• σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με τη συγκέντρωση του κάθε εκχυλίσματος.

Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 110 μg/ml έως 443 μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του *Carthamus lanatus* με IC₅₀ ίσο με 110 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του *Amaranthus blitum* με IC₅₀ ίσο με 443 μg/ml

Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας AAPH•, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Άρα σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, αφού την μικρότερη συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της ρίζας AAPH• παρουσιάζει το φυτικό εκχύλισμα *Carthamus lanatus* με τη μικρότερη τιμή IC₅₀, ίση με 110 μg/ml, αυτό σημαίνει ότι το εκχύλισμα αυτό έχει ισχυρότερη αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε σχέση με τα άλλα αφεψήματα.

4.7 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος *Carthamus lanatus* με τη μέθοδο XTT

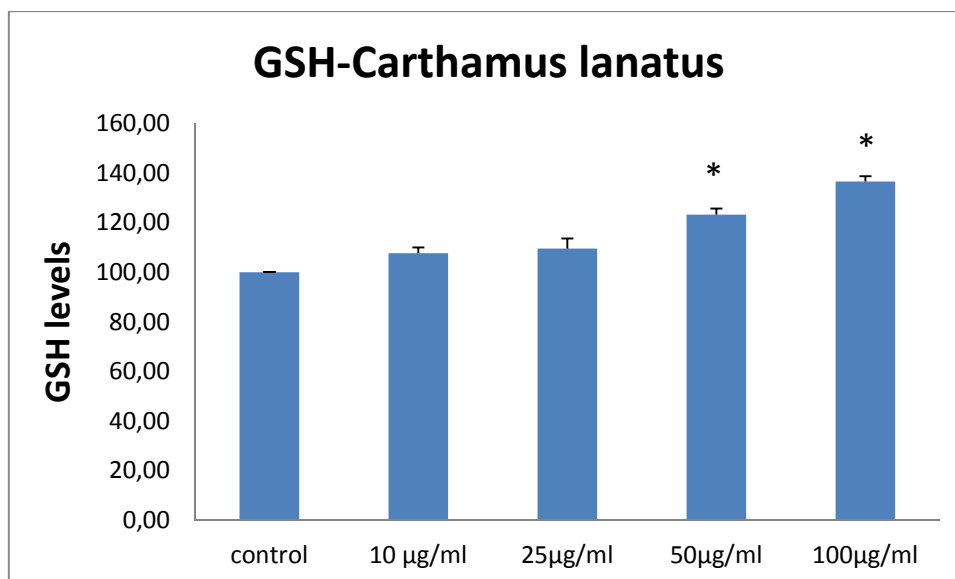
Το φυτικό εκχύλισμα *Carthamus lanatus* φαίνεται πως σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 100 μg/ml παρουσιάζει μία τάση για μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων.



Διάγραμμα 16: Αποτελέσματα από τη μέθοδο XTT.

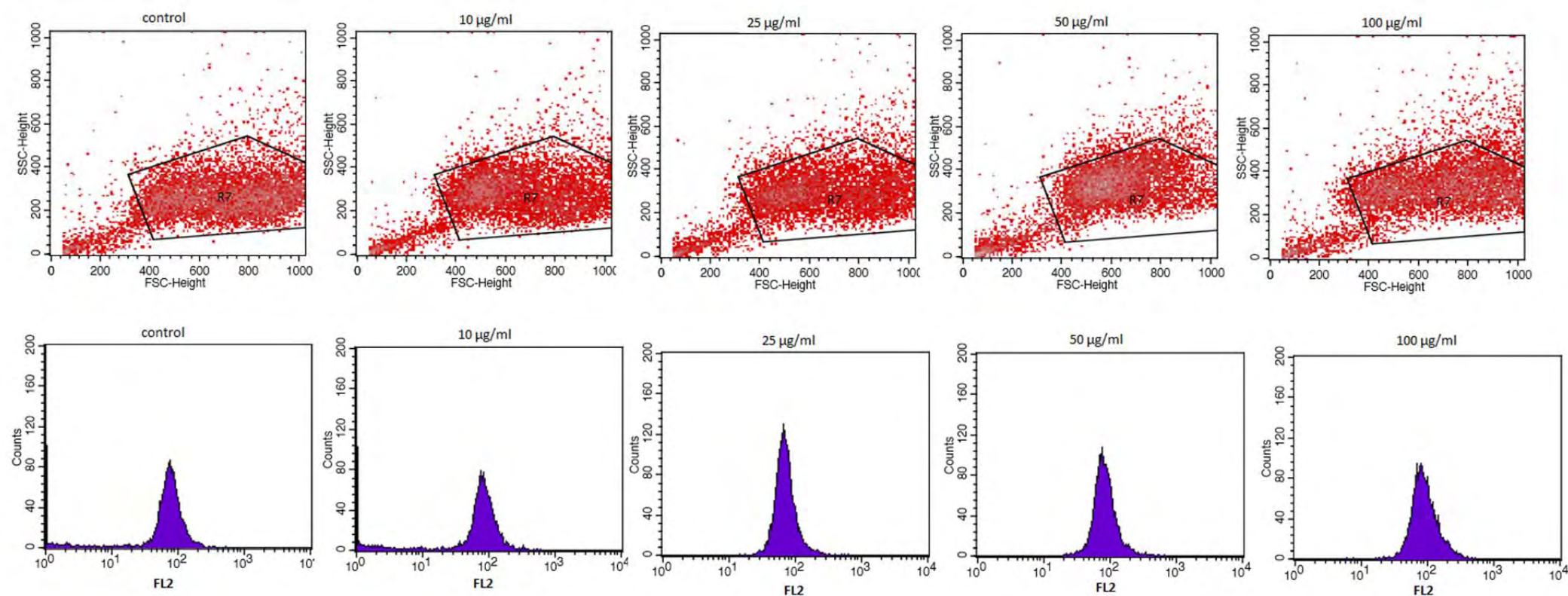
4.8 Προσδιορισμός επιπέδων GSH με κυτταρομετρία ροής

Τα επίπεδα της GSH προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής mercury orange. Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 18. Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control.



Διάγραμμα 17: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα GSH. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα της GSH σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος *Carthamus lanatus* (µg /ml).

Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα *Carthamus lanatus*, τα επίπεδα της GSH στα μυϊκά κύτταρα C2C12 αυξήθηκαν κατά 7,65%, 9,50%, 23,17% και 36,53% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα control, για τις συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 µg εκχυλίσματος/ml αντίστοιχα (Διάγραμμα 17). Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στις δύο τελευταίες συγκεντρώσεις 50 µg/ml (23,17%) και 100 µg/ml (36,53%). Στο Διάγραμμα 18 για τα μυϊκά κύτταρα C2C12, φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της GSH στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος (10, 25, 50 και 100 µg εκχυλίσματος/ml).



Διάγραμμα 18: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH).

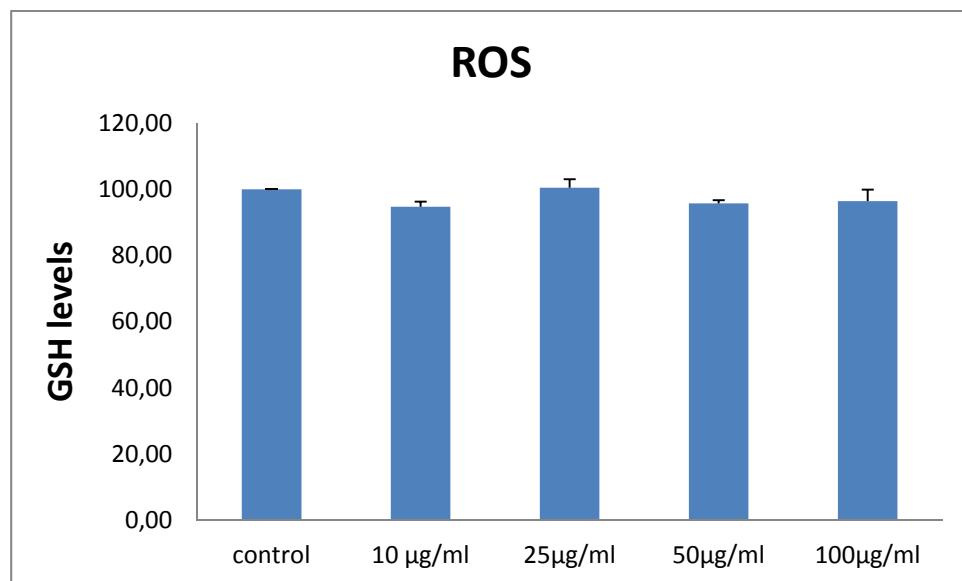
(A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και

(B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις : υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 µg/ml.

4.9 Προσδιορισμός επιπέδων ROS με κυτταρομετρία ροής

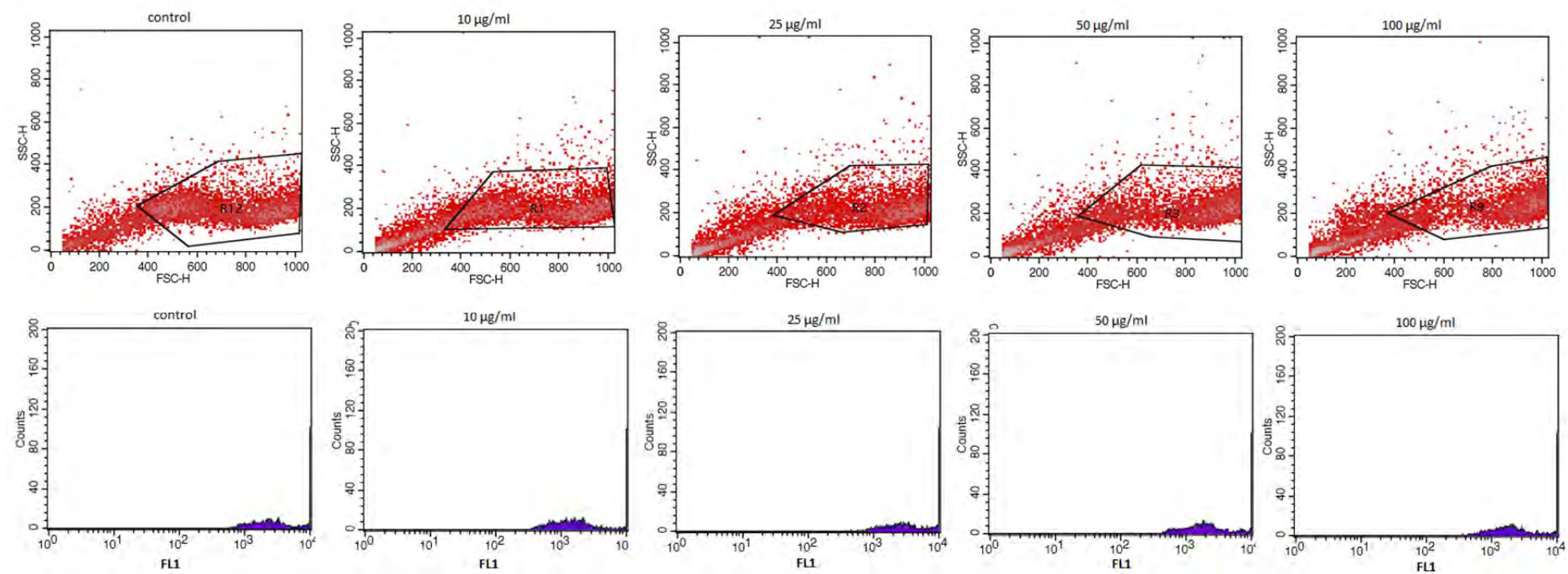
Τα επίπεδα των ROS προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής DCF-DA. Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 20 για τα μυϊκά κύτταρα C2C12. Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control .



Διάγραμμα 19: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα των ROS σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος *Carthamus lanatus* (µg /ml)..

Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα του *Carthamus lanatus*, τα επίπεδα των ROS στα μυϊκά κύτταρα C2C12 δεν παρουσίασαν κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σε καμιά από τις συγκεντρώσεις, 10, 25, 50 και 100 µg εκχυλίσματος/ml, που χρησιμοποιήθηκαν (Διάγραμμα 19).

Στο Διάγραμμα 20 για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος (10, 25, 50 και 100 µg εκχυλίσματος/ml).



Διάγραμμα 20: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS).

(A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και

(B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις : υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 µg/ml

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί τα τελευταία χρόνια, για την παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης, ως πηγή πρόσληψης φυτικών πολυφαινόλων, βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανός ρόλος στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), ο καρκίνος (Toyokuni, 1998), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), η αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), η πρόωρη γήρανση (Wiseman et al., 1995) και το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992). Έτσι καθώς τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή βιοδραστικών μορίων, αφού παράγουν αρκετά από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση λειτουργικών τους αναγκών, αποτελούν τόσο αυτά όσο και τα προϊόντα τους αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι να αυξάνεται τόσο η ζήτηση και η απαίτηση για τρόφιμα πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις από τους καταναλωτές όσο και η ανάγκη της βιομηχανίας τροφίμων για έρευνα, παραγωγή και κατοχύρωση τέτοιων καινοτόμων προϊόντων.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι βιολογικές επιδράσεις και ιδιαίτερα η αντιοξειδωτική δράση τριών φυτικών εκχυλισμάτων: του *Carthamus lanatus* (GREM_3), του *Crepis sancta* (LAEM_3) και του *Amaranthus blitum* (VEM_A1) με μεθόδους *in vitro*. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν αρχικά η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και η αναγωγική δύναμη όλων των φυτικών εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα επιδιόρθωσης θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA που προκαλούνται από τη ρίζα AAPH•, προκειμένου να δούμε την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση όλων των φυτικών εκχυλισμάτων. Τέλος στο φυτικό εκχύλισμα με τα περισσότερα ευεργετικά αποτελέσματα προχωρήσαμε σε περαιτέρω έρευνα, εξετάζοντας την επίδρασή του στην μυϊκή κυτταρική σειρά C2C12.

Αρχικά, όσον αφορά το εκχύλισμα του *Amaranthus blitum* (VEM_A1), οι κύριοι μεταβολίτες αυτού του εκχυλίσματος είναι οι τριτερπενικές σαπωνίνες, ενώ είναι σχετικά πτωχό σε φαινολικές ενώσεις (Μητάκου Σ., ΕΚΠΑ). Το χαμηλότερο

σχετικά με τα άλλα δύο εκχυλίσματα φαινολικό του φορτίο (62,66 mg GAE/g extract) είναι σε συμφωνία με τη μικρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH, ABTS και $O_2^{\bullet-}$, συγκριτικά με τα δύο άλλα εκχυλίσματα, αλλά εξακολουθεί να παρουσιάζει βιολογική σημασία. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα παρουσίασε ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH καθώς η τιμή του IC_{50} ήταν 80 μg/ml. Όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, ήταν εξίσου ισχυρή καθώς η τιμή του IC_{50} ήταν 72 μg/ml. Επίσης, η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ παρουσίασε IC_{50} ίσο με 21 μg/ml. Εξίσου σημαντική ήταν η αναγωγική ισχύς του εκχυλίσματος, της τάξης των 65 μg/ml. Επίσης, το εκχύλισμα του *Amaranthus blitum* έδειξε δόσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση της ρίζας ROO^{\bullet} καθώς η IC_{50} τιμή ήταν 443 μg/ml. Τα αποτελέσματα μας όσον αφορά την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του *Amaranthus blitum* επιβεβαιώνονται και από άλλες μελέτες όπου βρέθηκε ότι τα φύλλα του *Amaranthus blitum* είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι οποίες δρουν ως εξουδετερωτές ελευθέρων ριζών (Amornrit W. et al., 2016; Ozsoy et al., 2009; Iqbal et al., 2012; Anitha and Ponbavani, 2013; López-Mejía et al., 2014; Sowjanya et al., 2014). Επίσης σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι το *Amaranthus blitum* μπορεί να ασκήσει τις ευεργετικές επιδράσεις του μέσω του συμπλέγματος Nf-kB (Morgan and Liu, 2011). Αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με τα δικά μας αποτελέσματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η κατανάλωση αυτού του φυτού μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως η γήρανση και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Σχετικά με το εκχύλισμα του *Crepis sancta* (LAEM_3), το εκχύλισμα αυτό είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό οξύ ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη (Μητάκου Σ., ΕΚΠΑ). Το υψηλό φαινολικό του φορτίο (288 mg GAE/g extract) συνηγορεί με την ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH, ABTS και $O_2^{\bullet-}$. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα παρουσίασε ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH καθώς η τιμή του IC_{50} ήταν 12,6 μg/ml. Όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, ήταν εξίσου ισχυρή καθώς η τιμή του IC_{50} ήταν 12 μg/ml. Επίσης, η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ παρουσίασε IC_{50} ίσο με 7,5 μg/ml. Εξίσου σημαντική ήταν η αναγωγική ισχύς του εκχυλίσματος ήταν της τάξης των 10,5 μg/ml.

Επίσης, το εκχύλισμα του *Crepis sancta* έδειξε δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση της ρίζας ROO• καθώς η IC₅₀ τιμή ήταν 132 μg/ml. Άλλες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα φύλλα, η ρίζα και το άνθος του *Crepis sancta* διαθέτει αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Okmen et al., 2015).

Τέλος, το εκχύλισμα του *Carthamus lanatus* (GREM_3) σύμφωνα με τη ποιοτική ανάλυση είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη και η λουτεολίνη αλλά και σε υδροξυκιναμικά οξέα όπως το χλωρογενικό οξύ (Μητάκου Σ., ΕΚΠΑ). Το υψηλό φαινολικό του φορτίο (408,04 mg GAE/g extract) είναι σε συμφωνία με την ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH, ABTS και O₂•⁻. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα παρουσίασε πολύ ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH καθώς η τιμή του IC₅₀ ήταν 8 μg/ml. Όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, ήταν εξίσου ισχυρή με τιμή IC₅₀ ίσο με 7,9 μg/ml. Έπειτα η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O₂•⁻ παρουσίασε IC₅₀ ίσο με 6,3 μg/ml. Εξίσου σημαντική ήταν η αναγωγική ισχύς του εκχυλίσματος, της τάξης των 5 μg/ml. Επίσης, το εκχύλισμα του *Carthamus lanatus* έδειξε δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση της ρίζας ROO• καθώς η IC₅₀ τιμή ήταν 110 μg/ml.

Επομένως, τα προαναφερθέντα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ελληνικά εδώδιμα φυτά παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών, ειδικά τα φυτά τα οποία είχαν υποστεί και εκχύλιση με ρητίνη όπως το *Carthamus lanatus* και το *Crepis sancta*, και κατά συνέπεια είχαν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Ήταν χαρακτηριστικό ότι η σειρά δραστηριότητας των 3 εκχυλισμάτων όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση (*Carthamus lanatus* > *Crepis sancta* > *Amaranthus blitum*) ήταν σε απόλυτη συμφωνία με το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Αυτό δείχνει ότι η αντιοξειδωτική δράση αυτών των εκχυλισμάτων οφείλεται κυρίως στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Επίσης παρατηρήσαμε ότι σε όλα τα εκχυλίσματα οι τιμές IC₅₀ του DPPH και του ABTS ήταν κοντά. Αυτό σημαίνει ότι πιθανώς οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες των εκχυλισμάτων είναι υπεύθυνες για την εξουδετέρωση αυτών των ριζών παρά το ότι η μέθοδος του ABTS γίνεται σε υδατικό διαλύτη ενώ του DPPH σε μη πολικό (μεθανόλη). Προηγούμενες μελέτες με τα ελληνικά φυτικά εκχυλίσματα *Leguminosae* και *Lamiaceae* sp. έδειξαν επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενισχύοντας την άποψη ότι τα ενδημικά φυτά μπορούν να αποτελέσουν

πολύτιμη πηγή διατροφικών χημειοπροστατευτικών ενώσεων (Stagos D et al. 2012; Spanou C. et al., 2007).

Αυτό το στάδιο εξέτασης επέτρεψε την επιλογή του πιο ισχυρού φυτού για περαιτέρω μελέτες. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του *Carthamus lanatus* σε μυοβλάστες ποντικού (κυτταρική σειρά C2C12). Αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική συγκέντρωση του *Carthamus lanatus* με τη μέθοδο XTT και στη συνέχεια τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής.

Η κυτταρομετρία ροής έδειξε πως συνολικά το εκχύλισμα βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) που φτάνει και το 36,53% στη μεγαλύτερη δόση χορήγησης του φυτικού εκχυλίσματος (100 $\mu\text{g/ml}$). Η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε με ένα από τα βασικά συστατικά αυτού του εκχυλίσματος όπως είναι η κερκετίνη, έδειξαν ότι τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) αυξήθηκαν και τα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) μειώθηκαν σε ομάδες ποντικών που εκτέθηκαν σε αυτήν. Αυτό είναι κάτι που υποδηλώνει ότι η κερκετίνη ίσως να προστατεύει από το οξειδωτικό στρες έμμεσα, με ενίσχυση της παραγωγής της ενδογενούς γλουταθειόνης (M. Zhang et al., 2011). Γενικότερα, όπως αναφέρεται και παρακάτω όλα τα κύρια συστατικά του φυτικού εκχυλίσματος *Carthamus lanatus* (χλωρογενικό οξύ, λουτεολίνη και κερκετίνη) συμβάλουν στην αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) είτε δρώντας απευθείας στα ένζυμα σύνθεσής της είτε μέσω άλλων μονοπατιών όπως αυτό του Nrf2 (Ningjian Liang and David D. Kitts, 2016).

Στις ελεύθερες ρίζες (ROS), που επίσης προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής, η επώαση με το φυτικό εκχύλισμα του *Carthamus lanatus*, στα κύτταρα C2C12 δεν παρουσίασε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σε καμιά από τις συγκεντρώσεις, 10, 25, 50 και 100 μg εκχυλίσματος/ml που χρησιμοποιήθηκαν. Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος οξειδωτικός παράγοντας, μετρήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα ROS και είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι φυσιολογικά απαιτούνται ορισμένες ποσότητες ελευθέρων ριζών για την κυτταρική ομοιόσταση και την απαραίτητη μεταγωγή σήματος.

Αρκετές μελέτες υπογραμμίζουν την πιθανή βιοδραστικότητα των ενώσεων που περιέχουν τα προαναφερθέντα εκχυλίσματα. Για παράδειγμα, τα χλωρογενικά οξέα είναι γνωστά αντιοξειδωτικά και ενώσεις που ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 και υπάρχουν στον καφέ (Santana-Galvez J. et al., 2017; Priftis A. Et al., 2017; Ningjian L. et al., 2015), ενώ το κιχορικό οξύ παρουσιάζει τις ίδιες ιδιότητες (Liu Q. et al., 2017). Η λουτεολίνη σε άλλες μελέτες που διεξήχθησαν φάνηκε να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες (π.χ. DPPH), να προκαλεί αύξηση της εξαρτώμενης από το στοιχείο ARE μεταγραφικής δραστηριότητας και να ρυθμίζει θετικά τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ενεργοποιώντας το μονοπάτι Keap1-Nrf2-ARE (Zhang YC et al., 2013). Η κερκετίνη μέσω άλλων μελετών έχει αποδειχθεί ένα εξαιρετικό in vitro αντιοξειδωτικό, καθώς είναι ένας από τους ισχυρότερους εξουδετερωτές ελευθέρων ριζών (Hanasaki et al., 1994, Cushnie and Lamb, 2005). Ωστόσο, τα εκχυλίσματα μας περιλαμβάνουν πολυφαινολικά μίγματα, συνεπώς πρέπει να ληφθούν υπόψη και συνεργιστικές επιδράσεις που εμφανίζουν αυτές οι ενώσεις (Barrajón-Catalán E. et al., 2014).

Συνοψίζοντας από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι τα αφενήματα των εδώδιμων χόρτων που καταναλώνονται παραδοσιακά στην Ελλάδα και αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν επιδείξει ισχυρή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Ειδικότερα, το *Carthamus lanatus* παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Τα βιοδραστικά συστατικά του εκχυλίσματος καθώς και το υψηλό του πολυφαινολικό περιεχόμενο δικαιολογούν τα προηγούμενα αποτελέσματα. Η κερκετίνη, η λουτεολίνη και το χλωρογενικό οξύ που περιέχει το *Carthamus lanatus*, κατανέμονται ευρέως στα φυτά και παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία και τη φυσιολογία των φυτών, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν σημαντική κατηγορία φυτικών συστατικών με φαρμακολογική δράση (Middleton E. et al., 2000). Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για φυσικές πηγές που περιέχουν αυτές τις ενώσεις ως λειτουργικά συστατικά για την πρόληψη ασθενειών και την προαγωγή της υγείας. Έχουν αναγνωρισθεί ότι διαθέτουν πολλές βιοδραστικές δραστηριότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές και ηπατοπροστατευτικές δραστηριότητες, καθώς επίσης και ότι είναι ισχυροί εξουδετερωτές ριζών όπως αναφέραμε και παραπάνω κυρίως λόγω της ειδικής χημικής τους δομής όπως είναι η θέση των υδροξυλικών

ομάδων, η πολικότητα και τα τμήματα αγλυκόνης αυτών (Kim SM et al., 2011) (Wolfe KL et al., 2008).

Βέβαια, θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν τα επιμέρους στοιχεία των εκχυλισμάτων ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική και η αντιμεταλλαξογόνος δράση. Οι εφαρμογές της έρευνας όσον αφορά την αντιμεταλλαξογόνο και αντιοξειδωτική δράση αυτού του φυτού θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων, όπως βιολειτουργικών τροφίμων και ποτών, είτε άλλου τύπου προϊόντων, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρωμάτων διατροφής.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, 26(3), 151–194.
- Amornrit W. and Santiyanont R. (2016). Neuroprotective effect of *Amaranthus lividus* and *Amaranthus tricolor* and their effects on gene expression of RAGE during oxidative stress in SH-SY5Y cells, *Genetic and molecular research*, 15 (2): gmr.15027562
- Anitha.R and S.Ponbavani (2013). Antioxidant and anticoagulant activity in *amaranthus gangeticus* l. aqueous leaf extract, *world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, volume 2, issue 5, 2682-2688.
- Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA and Micol V: Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: Far beyond their antioxidant properties. *Adv Exp Med Biol* 824: 141–159, 2014.
- Baruchel S, Wainberg MA (1992). The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus, *J Leukoc biol.*, 52(1):111-4.
- Bocheva A., Mikhova B., R.Taskovac, M.Mitova, H.Duddeck, 2003. Antiinflammatory and analgesic effects of *Carthamus lanatus* aerial parts, *Fitoterapia*, Volume 74, Issue 6, September, Pages 559-563
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cushnie TP, Lamb AJ. *Int J* (2005). Antimicrobial activity of flavonoids, *International journal of antimicrobial agents*, 26(5):343-56.
- D' Archivio, M., Filesì, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115. Journal Article, Review.
- Enke N., Fuchs J, Gemeinholzer B., 2011. Shrinking genomes? Evidence from genome size variation in *Crepis* (Compositae), *Plant biology*, Volume 13, Issue 1, Pages 185–193.

- Eric Imbert, José Escarré, and Jacques Lepart, 1996. Achene Dimorphism and Among-Population Variation in *Crepis sancta* (Asteraceae), *International Journal of Plant Sciences*, Volume 157, Number 3.
- Evans Rice C., Burdon R., 1993. Free radical–lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 32, 71–110.
- Giambanelli E. et al., 2017. Identification and quantification of phenolic compounds in edible wild leafy vegetables by UHPLC/Orbitrap-MS, *Science of Food and Agriculture*, 10.1002/jsfa.8541.
- Grace B. S., A. W. Sheppard, R. D. B. Whalley and B. M. Sindel, 2002. Seedbanks and seedling emergence of saffron thistle (*Carthamus lanatus*) in eastern Australian pastures, *Australian Journal of Agricultural Research*, 53(12) 1327 - 1334 .
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716.
- Halliwell B and Cross C E (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress, *Environmental Health Perspect*, 102(Suppl 10): 5–12.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Hanasaki Y. , Ogawa S. , Fukui S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, 16 pp. 845-850
- Harborne, J. B. (1986). Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in Clinical and Biological Research*, 213, 15–24. Journal Article, Review.
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. <https://doi.org/10.1021/jf061478a>
- Heinen CD, Wilson T, Mazurek A, Berardini M, Butz C, Fishel R. (2002). HNPCC mutations in hMSH2 result in reduced hMSH2-hMSH6 molecular switch functions, *Cancer Cell*, 1(5):469-78.
- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., ... Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4), 381–386.
- Iqbal Muhammad Javid, Sumaira Hanif , Zahed Mahmood, Farooq Anwar and Amer Jamil (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of Chowlai (*Amaranthus viridis* L.) leaf and seed extracts, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 6(27), pp.4450-4455.
- Jiandie Lin, Christoph Handschin, Bruce M. Spiegelman, (2005). Metabolic control

through the PGC-1 family of transcription coactivators, *Cell Metabolism*, Volume 1, Issue 6, Pages 361-370

Karl J. Hunter, John M. Fletcher (2002), The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 399–406.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 Suppl, 71S–88S.

Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V, ... Gansler, T. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), 30–67. <https://doi.org/10.3322/caac.20140>

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., & Amendola, V. (2006). *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Phytochemistry* (Vol. 661).

Liu Q, Hu Y, Cao Y, Song G, Liu Z and Liu X: Chicoric Acid Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress via Promoting the Keap1/Nrf2 Transcriptional Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells and Mouse Brain. *J Agric Food Chem* 65: 338–347, 2017.

López-Mejía OA , López-Malo A , Palou E (2014). Antioxidant capacity of byproducts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 64(1):50-58

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.

Marie L.Ancelin, Henri J.Vial, (1989). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in Plasmodium-infected erythrocytes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, Volume 1001, Issue 1, Pages 82-89

Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 81(1), 326S–329. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/81/1/326S>

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacological Reviews.*, 52(4):673-751.

Mitova M, Taskova R, Popov S, Berger RG, Krings U, Handjieva N., 2003. GC/MS analysis of some bioactive constituents from *Carthamus lanatus* L., *Journal of biosciences*, 58(9-10):697-703.

Morgan Michael J and Zheng-gang Liu, (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling, *Cell research*, 21(1): 103–115.

- Ningjian Liang and David D. Kitts (2016). Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions, *Nutrients*, 8(1): 16.
- Okmen A.S., (2015). Antioxidant and antibacterial activities of different plants extracts against staphylococcus aureus isolated from soccer player's shoes and knowledge and applications about foot hygiene of the soccer players, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 12(3):143-149.
- Ozsoy N. , Yilmaz T., Kurt O., Can A., Yanardag R. (2009). In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L., *Food Chemistry*, Volume 116, Issue 4, 15 October, Pages 867-872
- Priftis A, Goutzourelas N, Chalabalaki M, *et al.*: Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev*, 2017.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 304–317.
- Santana-Galvez J, Cisneros-Zevallos L and Jacobo-Velazquez DA: Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules* 22, 2017.
- Sowjanya Pulipati, P. Srinivasa Babu, M. Lakshmi Narasu (2014). Phytochemical and pharmacological potential of *amaranthus viridis* l. A review. *International journal of phytomedicine*, 6;322-326.
- Spanou C, Stagos D, Tousias L, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL and Kouretas D: Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Res* 27: 3403–3410, 2007.
- Stagos D, Portesis N, Spanou C, et al.: Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol* 50: 4115–4124, 2012.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 31S–38S.
- Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. (1998). The role of oxidative stress in the genesis of heart disease, *Cardiovascular research*, 40(3):426-32.
- Taskova R, Mitova M, Mikhova B, Duddeck H., 2003. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L., *Journal of biosciences*, 58(9-10):704-7.

- Toyokuni Shinya, Kunihiro Okada, Shohei Kondo, Hiroaki Nishioka, Tomoyuki Tanaka, Yasuyuki Nishiyama, Okio Hino, Hiroshi Hiai (1998). Development of High-grade Renal Cell Carcinomas in Rats Independently of Somatic Mutations in the *Tsc2* and *VHL* Tumor Suppressor Genes, *Cancer science*, Volume 89, Issue 8, Pages 814–820
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vainio, H. (1999). Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story. *British Medical Bulletin*, 55(3), 593–599. Journal Article, Review.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Wiseman Helen, Harparkash Kaur, Barry Halliwell (1995). DNA damage and cancer: Measurement and mechanism, *Cancer Letters*, Volume 93, Issue 1, 29, Pages 113–120
- Wright G.C, J.R McWilliam and R.D.B Whalley, 1980. Effects of Light and Leaching on Germination of Saffron Thistle (*Carthamus lanatus* L.), *Australian Journal of Plant Physiology*, 7(5) 587 – 594.
- Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits, *J Agric Food Chem.*, 24;56(18):8418–26.
- World Cancer Research Fund, & American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Cancer Research.*
- Zhang, M., Swarts, S. G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., ... Okunieff, P. (2011). Antioxidant properties of quercetin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 701, 283–289. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7756-4_38
- Zhang YC, Gan FF, Shelar SB, Ng KY, Chew EH (2013). Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury, *Food Chem Toxicol.*, 59:272–80.
- Zidorn C., (2008). Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae, *Phytochemistry*, Volume 69, Issue 12, Pages 2270–2296.